



RICARDO JOSÉ LIMA DA SILVA VIEIRA

Licenciatura em Engenharia Alimentar

ALERGÉNIOS ALIMENTARES: UM ESTUDO SINÓPTICO

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Fernando José Cebola Lidon, Prof. Doutor, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, FCT/UNL

Arguente: Prof.^a Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, FCT/UNL

Vogal: Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon, FCT/UNL



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Outubro de 2015



RICARDO JOSÉ LIMA DA SILVA VIEIRA

Licenciatura em Engenharia Alimentar

ALERGÉNIOS ALIMENTARES: UM ESTUDO SINÓPTICO

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Fernando José Cebola Lidon, Prof. Doutor, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, FCT/UNL

Arguente: Prof.^a Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, FCT/UNL

Vogal: Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon, FCT/UNL



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Outubro de 2015

Copyright

Ricardo José Lima da Silva Vieira

Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT/UNL)

Universidade Nova de Lisboa (UNL)

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus querido pais, incansáveis na sua dedicação e amor...

AGRADECIMENTOS

É com manifesta satisfação que expresso o testemunho dos meus reconhecidos agradecimentos a todos quantos contribuíram para que este estágio fosse realizado.

Ao Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon pela sua superior orientação científica e pelo incentivo no desenvolvimento deste trabalho. Muito grato lhe fico igualmente pelo empenho e pelo rigor com que, pacientemente, analisou o relatório, os sapientes conselhos que me concedeu para bem o executar e a amizade demonstrada ao longo deste percurso.

A todos os meus amigos e colegas, por toda a ajuda disponibilizada e por terem estado sempre presentes nas alturas que mais precisei.

Aos meus pais, que estiveram sempre presentes, pelo apoio incondicional e carinho constante que demonstraram, pelo estímulo nos momentos de dúvida e hesitação. Estou grato por tudo o que me ensinaram e pelo exemplo que para mim constituíram, ao longo de toda a minha vida.

A todos, o meu mais profundo e afectuoso obrigado.

RESUMO

A prevalência das alergias alimentares tem aumentado nas últimas décadas, constituindo um problema à escala mundial, o que tem incentivado o desenvolvimento dos estudos no âmbito da anafilaxia alimentar. Denominam-se por reacções adversas aos alimentos aquelas que envolvem mecanismos imunológicos, mediados pela imunoglobulina E (IgE), por outras células ou por ambas, cujas manifestações clínicas podem variar de urticária leve a reacções sistémicas com morte por anafilaxia.

Os alimentos alérgicos mais comuns são: leite, soja, ovo, trigo e amendoim, sendo a alergia ao leite de vaca a mais comum nas crianças e a do amendoim a mais persistente.

Um diagnóstico correcto é indispensável, não só para direccionar o tratamento, através da restrição do alimento alérgico, como também para evitar a privação desnecessária do mesmo, que, se prolongada, pode afectar negativamente o estado nutricional do paciente.

Têm sido desenvolvidos métodos de detecção e quantificação de alergénios, nesse garante de um diagnóstico clínico correcto, baseados essencialmente na tecnologia do ácido desoxirribonucleico e das proteínas.

Os compostos proteicos podem ter uma origem animal ou vegetal, sendo agrupados e classificados em famílias, de acordo com um conjunto de propriedades bioquímicas e moleculares. A avaliação do respectivo potencial alergénico tem sido direccionada através dos estudos da sua digestibilidade, sobretudo com modelos que usam a pepsina. Neste enquadramento, a metodologia da Análise de Risco de um dado alergénio alimentar para a Saúde Pública torna-se relevante, por resumir os critérios a ter em conta nas tomadas de decisão por parte da Gestão de Risco.

Neste estudo efectua-se uma abordagem teórica sobre as alergias e alergénios alimentares, onde se perspectiva uma visão global sobre os respectivos mecanismos de reacção, alergias mais comuns e alimentos associados, análise de risco, classificação bioquímica, técnicas de detecção/quantificação de alergénios alimentares e o potencial alergénico das proteínas.

Palavras-chave: Alergenicidade proteica, Alergénio alimentar, Alergia alimentar; Detecção/Quantificação de alergénios, Digestibilidade proteica.

ABSTRACT

The prevalence of food allergies has increased in recent decades, building a worldwide problem which has encouraged the development of studies in connection with food anaphylaxis. The adverse reactions to food involve immune mechanisms which may be mediated by immunoglobulin E (IgE), by other cells or both whose clinical symptoms can range from mild systemic reactions urticaria to death from anaphylaxis.

The most common allergenic foods are milk, soy, egg, wheat, and peanuts, with the cow's milk allergy being the most common in children, and the more persistent one the peanut allergy.

A correct diagnosis is vital, not only for directing the treatment by allergic food restriction, but also to avoid unnecessary withdrawal thereof, which, if prolonged, can adversely affect the nutritional status of the patient.

There have been developed methods of detection and quantification of allergens that ensures a correct clinical diagnosis based on the DNA and proteins technology.

Protein compounds may have an animal or vegetable origin and be classified into families grouped according to a set of biochemical and molecular properties. The assessment of their allergenic potential has been directed through the studies of their digestibility, especially with models that use the enzyme pepsin.

The methodology of risk analysis of a given food allergen for Public Health is also addressed, where the criteria to be taken into account in the decision-making by the Risk Management are summarized.

The main objective of this work was to make a theoretical approach to allergies and food allergens, giving an overview of the reaction mechanisms involved, the most common allergies and food involved, risk analysis, biochemical classification and detection/quantification techniques on food allergens and further studies on the potential allergenicity of proteins.

Key-Words: Food allergen, Food allergy, Detection/Quantification of allergens, Protein allergenicity, Protein digestibility.

ÍNDICE DE MATÉRIAS

ÍNDICE DE MATÉRIAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
1. Introdução	1
2. Alergias e Alergênios Alimentares.....	3
2.1. Definição da doença e características epidemiológicas.....	3
2.2. Prevalência.....	5
2.3. Epidemiologia: para além da prevalência	7
2.4. Fisiopatologia.....	8
2.4.1. Mecanismos imunológicos	8
2.4.2. Sintomas e severidade.....	11
2.5. Alergênios e alimentos alérgicos	16
2.6. Diagnóstico	25
2.7. Tratamento.....	29
2.8. Prevenção.....	33
2.9. Alergênios e rotulagem/legislação	36
3. Proteínas de Origem Animal e Vegetal.....	39
3.1. Proteínas animais	39
3.1.1. Tropomiosinas	40
3.1.2. Caseínas.....	40
3.1.3. Outras famílias de alergênios alimentares de origem animal	41
3.2. Proteínas vegetais.....	41
3.2.1. Prolaminas.....	42
3.2.2. Albuminas 2S.....	42
3.2.3. Proteínas de transferência de lipídios não específicas (<i>nsLTPs</i>).....	43
3.2.4. Inibidores da α -amilase e da tripsina.....	43
3.2.5. Prolaminas dos cereais	43
3.2.6. Família das “ <i>Cupins</i> ”	44

3.2.7. Família das <i>Bet v 1</i>	45
3.2.8. Outras famílias de alergénios alimentares vegetais	46
4. Critérios de Identificação de Alimentos Alérgicos	51
4.1. Aspectos gerais	52
4.2. Verificação do diagnóstico e severidade	53
4.3. Alergenicidade	54
4.4. Prevalência e incidência	57
4.5. Caracterização do risco.....	58
4.6. Exposição.....	58
4.7. Aplicação dos critérios	59
5. Classificação/ Propriedades Moleculares dos Alergénios	61
5.1. O factor abundância	63
5.2. Ligações aos iões ligando	64
5.3. Estabilidade ao processamento e digestão	65
5.4. Glicosilação	66
5.5. Estruturas repetitivas, agregados e “glycation”	66
5.6. Interação com membranas e outras estruturas lipídicas	68
5.7. Reactividade cruzada.....	68
5.8. Classes de alergénios alimentares	69
6. Métodos Analíticos para Avaliação de Alergénios	71
6.1. Métodos de análise qualitativa e quantitativa	71
6.1.1. Métodos de detecção e quantificação de alergénios	72
6.1.2. Métodos de detecção baseados em sequências específicas de DNA.....	73
6.1.3. <i>PCR</i>	74
6.1.4. <i>PCR</i> em tempo real	77
6.1.5. <i>PCR-ELISA</i>	78
6.1.6. <i>MultiplexPCR</i>	79
6.1.7. Vantagens e desvantagens dos métodos baseados no DNA	79
6.2. Métodos de detecção/quantificação de alergénios baseados em proteínas	80
6.2.1. <i>ELISA</i>	82
6.2.2. <i>Western Blot</i>	85
6.2.3. <i>Dot Immunoblotting</i>	87

6.2.4. <i>RAST</i> e <i>EAST</i>	88
6.2.5. <i>ImmunoCAP</i>	88
6.2.6. <i>SDS-PAGE</i> e <i>IEF-PAGE</i> com <i>Immunoblotting</i>	89
6.2.7. Imunodifusão	90
6.2.8. Imunoelectroforeses	92
6.3. Outros ensaios e imunoenaios	94
6.3.1. Ensaio de fluxo lateral	95
6.3.2. Imunoenaios com biossensores	97
6.3.3. Detecção/quantificação de alérgenos baseada na espectrometria de massa	98
7. Digestibilidades	101
7.1. Modelos de digestão com pepsina	103
7.1.1. Alérgenos alimentares que sensibilizam através do trato gastrointestinal	103
7.1.2. Alérgenos alimentares não sensibilizantes	105
7.2. Parâmetros que afectam a pepsinólise	106
7.2.1. pH	106
7.2.2. Rácio da pepsina/proteína	107
7.3. Efeitos da matriz alimentar e interacções com outros ingredientes	109
7.4. Modelos de digestão multifásicos	109
7.4.1. Modelos estáticos	110
7.4.2. Modelos dinâmicos	110
8. Conclusão	113
9. Bibliografia	117
10. Anexos	147
Anexo I	148
Anexo II	151
Anexo III	152
Anexo IV	153
Anexo V	154
Anexo VI	155
Anexo VII	156
Anexo VIII	157
Anexo IX	158

Anexo X	159
Anexo XI	161
Anexo XII	162
Anexo XIII	163
Anexo XIV	164

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. – Diferentes tipos de reacções alérgicas	9
Figura 2.2. – Mecanismo da reacção imunológica mediada pela imunoglobulina IgE.....	10
Figura 2.4. – Algoritmo simplificado para o diagnóstico e gestão de uma alergia alimentar	32
Figura 3.1. – Estruturas secundárias dos alergénios da família das prolamínas.	44
Figura 3.2. - Estruturas das proteínas da família das cupinas.....	45
Figura 4.1. - Esquema de critérios utilizados para identificar os alimentos alérgicos de importância para a saúde pública.....	52
Figura 4.2. - Ilustração da relação genérica entre a dose de proteína alergénica e a frequência de reacções adversas em estudos clínicos de desafio. Uma dose teórica de elicitação (<i>DE</i>) pode ser extrapolada a partir do gráfico de respostas experimentais a uma gama de doses de desafio padrão.....	56
Figura 4.3. – Representação teórica do agrupamento de alimentos feito pela avaliação de risco, quando se decide se um alimento alergénico é importante na perspectiva da saúde pública	60
Figura 5.1. – União com o ligante	64
Figura 6.1. - Representação esquemática das três fases da técnica de <i>PCR</i>	75
Figura 6.2. – Esquema representativo do teste de <i>ELISA</i> em formato de <i>sandwich</i> (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) para a detecção de um antígeno alvo.....	83
Figura 6.3. – Esquema representativo do fundamento dos quatro modelos do método de <i>ELISA</i>	85
Figura 6.4. – Montagem do <i>Western Blot</i> em <i>sandwich</i>	86
Figura 6.5. – Esquema representativo do teste de imunodifusão de precipitação em tubo	90
Figura 6.6. – Esquema representativo do método de imunodifusão radial simples	91
Figura 6.7. – Esquema representativo do procedimento do método de difusão	92
Figura 6.8. – Esquema representativo do método da imuno-electroforese convencional.....	93
Figura 6.9. – Esquema do método da Imuno-electroforese <i>Rocket</i>	94
Figura 6.10. - Arquitectura do ensaio de fluxo lateral	96
Figura 6.11. - Principio do imunoensaio de biossensor baseado na ressonância de plasmões de superfície.	98
Figura 7.1. - Digestão fisiológica gástrica de proteínas pela pepsina. Após a activação da pepsina, a fenda de ligação ao substrato fica acessível às proteínas, dando lugar à clivagem em peptídeos	103
Figura 2.3. – Esquema geral do diagnóstico de uma alergia alimentar.....	158

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. - Condições alérgicas específicas induzidas por alimentos.	4
Tabela 2.3. - Observações sobre as alergias alimentares (ou de outras doenças atópicas) verificadas em estudos epidemiológicos da população em geral.	8
Tabela 2.4. – Sintomas das reacções alérgicas induzidas por alimentos.	15
Tabela 3.1. – Principais proteínas alergénicas vegetais.	42
Tabela 3.2. – Alergénios do sistema defensivo das plantas.	47
Tabela 3.3. – Outras proteínas alérgicas estruturais e metabólicas.	49
Tabela 4.1. -Tipo e nível (peso) das evidências dos dados clínicos nas alergias alimentares mediadas pela IgE.	53
Tabela 4.2. -Tipo e nível (peso) de evidências na potência alergénica, severidade e prevalência das reacções.	55
Tabela 4.3. - Factores a considerar na avaliação de risco da exposição a um alimento alergénico.	58
Tabela 6.1. – Aplicações do PCR para a detecção de DNAC de alergénios alimentares.	76
Tabela 7.3. – Digestibilidade/estabilidade proteica em fluido gástrico simulado (<i>FGS/SGF</i>), de alergénios alimentares vegetais não-sensibilizantes.	105
Tabela 7.4. – Mecanismos de acção dos fármacos utilizados na medicação de supressão de ácidos no estômago.	108
Tabela 7.5. – Factores relevantes na digestão gastrointestinal dos alergénios.	111
Tabela 2.2. - Rácios das prevalências estimadas das principais alergias alimentares, incluindo as idades, em estudos recentes.	148
Tabela 2.5. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia às proteínas do leite.	151
Tabela 2.6. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia ao ovo.	152
Tabela 2.7. - Alimentos a excluir para o caso da alergia ao amendoim e aos frutos de casca rija.	153
Tabela 2.8. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia ao trigo.	154
Tabela 2.9. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia à soja.	155
Tabela 2.10. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia ao peixe.	156

Tabela 2.11. - Alimentos a excluir para o caso da alergia ao marisco (crustáceos) e aos moluscos	157
Tabela 5.1. - Exemplos de reactividades cruzadas entre alimentos e outros agentes vegetais ou animais.	159
Tabela 2.12. – Estratégias imunoterapêuticas seleccionadas.....	161
Tabela 7.1. – Digestibilidade/estabilidade proteica em fluído gástrico simulado (<i>SGF</i>) de alergénios alimentares vegetais, suspeitos de sensibilizarem através do tracto gastrointestinal.	162
Tabela 7.2. - Digestibilidade/estabilidade proteica em fluído gástrico simulado (<i>FGS/SGF</i>) de alergénios alimentares de origem animal	163
Tabela 6.1. - Aplicações de ELISA seleccionadas para a detecção de alergénios alimentares ...	164

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Alergia Alimentar

ALV: Alergia ao leite de vaca

APLV: Alergia à proteína do leite de vaca

BSA: Albumina do soro do leite de bovino

DBPCFC: *Double-blind Placebo Controlled Food Challenge* (desafio de duplo conhecimento, com efeito *placebo* controlado)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EAACI: European Academy of Allergology and Clinical Immunology

EAST: Enzyme allergosorbent test (teste enzimático)

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)

EUA: Estados Unidos da América

GIT: Trato gastrointestinal

IEF-PAGE: Electroforese em gel de poliacrilamida, usando o ponto isoeléctrico proteico

IgA: Imunoglobulina A

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

LOD: Limite de detecção

LOQ: Limite de quantificação

LTP: Lipid Transfer Proteins

MS: Espectrometria de massa

nsLTPs: Proteínas de transferência de lipídios não-específicas

OAS: Oral Allergy Syndrome

OFC: *Oral Food Challenge* (desafio oral)

OIT: Imunoterapia oral

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: *Polymerase chain reaction* (reacção em cadeia da polimerase)

PRs: Proteínas relacionadas com a Patogénese

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

RAST: Radioallergosorbent Test

RAST: *Radioallergosorbent test* (teste radioalergoabsorvente)

SDS-PAGE: Electroforese em gel de poliacrilamida, com o detergente dodecil sulfato de sódio

SGF: *Simulated gastric fluid* (Fluido gástrico de simulação)

SIF: *Simulated intestinal fluid* (Fluido intestinal de simulação)

SPT: *Skin Prick Test* (Teste cutâneo de “picada”)

WAO: World Allergy Organization

1. Introdução

Nas sociedades desenvolvidas, ou em vias de desenvolvimento, tende a subsistir uma enorme variedade de alimentos disponíveis para consumo. Contudo, para uma pequena percentagem de indivíduos, alguns produtos podem causar reacções adversas que vão desde uma erupção cutânea ligeira a uma resposta alérgica sistémica, severa ou fatal [1].

A alergia alimentar é uma reacção de hipersensibilidade despoletada por mecanismos imunológicos, sendo mediada por anticorpos. Na maioria dos casos, os anticorpos responsáveis pela reacção alérgica pertencem ao isótipo da imunoglobulina E (IgE) [2], nomeadamente para a alergia ao ovo, ao leite de vaca e ao amendoim (maioritariamente nas crianças), ou relativamente aos frutos secos, trigo, soja, peixe e marisco, sendo estes os alimentos alérgicos mais comuns nos adultos [3]. A nível mais geral considera-se que a alergia alimentar (AA) traduz uma resposta anormal ou adversa do sistema imunológico a proteínas alimentares, absorvidas através da mucosa intestinal permeável [4].

A nível epidemiológico constata-se que nos países desenvolvidos, as alergias têm uma taxa de prevalência que oscila em torno de 20 - 30%. No grupo das doenças alérgicas, que incluem a asma, rinite, dermatite atópica, encontra-se a alergia alimentar [5]. Nos países ocidentais, as alergias alimentares afectam cerca de 5-6% das crianças e 3 - 4% dos adultos, parecendo estar aumentando a respectiva incidência [6]. Aponte-se contudo que nos adultos, caso se considerem as reacções leves aos frutos e vegetais, este valor pode ascender a 10% nalgumas regiões [7]. Note-se que este fenómeno resulta de factores genéticos, ambientais e alimentares, sendo o primeiro não alterável até ao momento [8].

Neste enquadramento torna-se fundamental conhecer este problema de saúde pública considerando nomeadamente o/a (s): parâmetros epidemiológicos, análise de risco, mecanismos bioquímicos e moleculares, diagnóstico e tratamento clínico, técnicas laboratoriais de detecção/quantificação de alergénios alimentares e respectiva classificação molecular, assim como outras áreas afins com destaque para a digestibilidade/estabilidade digestiva das proteínas e o seu potencial alergénico. Assim, neste estudo, que conta com sete capítulos, apresenta-se uma perspectiva global sobre conhecimentos actuais no âmbito das alergias alimentares, assim como algumas linhas de investigação e estudos científicos que vêm sendo desenvolvidos, considerando-se ainda algumas perspectivas futuras.

2. Alergias e Alergénios Alimentares

2.1. Definição da doença e características epidemiológicas

O termo *alergia alimentar* reporta a uma resposta imune dirigida a um alimento ou componente. Segundo o *Nacional Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) dos Estados Unidos da América, e de acordo com as linhas de orientação da *World Allergy Organization* (WAO), uma alergia alimentar decorre de um “efeito adverso para a saúde derivado de uma resposta imunológica específica, que ocorre consecutivamente à exposição a um dado alimento”. Isto engloba as respostas imunes mediadas por IgE, as não mediadas por IgE ou a combinação de ambas [9, 10].

As reacções mediadas pela IgE são caracterizadas por um conjunto de sintomas agudos que se desenvolvem 2 h após a ingestão ou exposição ao alimento indutor. Estas reacções envolvem tipicamente a pele, o trato gastrointestinal e o trato respiratório. Os sujeitos podem sofrer sensibilização alérgica (produção das IgE) aos alergénios sem manifestarem sintomas clínicos de uma reacção deste tipo. Assim a sensibilização por si só não é suficiente para definir uma alergia. A alergia mediada por IgE necessita de ambas, quer da presença de uma sensibilização, quer do desenvolvimento dos sinais específicos e sintomas de exposição ao alimento [9].

As reacções não mediadas por IgE (ex: mediadas por células) incluem as enterocolites induzidas por proteínas alimentares, proctocolites e as síndromes de enteropatia. Estas condições afectam principalmente as crianças nos primeiros anos de vida, que apresentam queixas abdominais tais como vómitos, cólicas abdominais, diarreia e, ocasionalmente, sangue nas fezes (aspectos que tendem a traduzir insuficiência de crescimento ou ganho de peso). Como exemplos de comorbidades resultantes de reacções mediadas, em simultâneo, por IgE ou não, aponta-se a esofagite eosinofílica e a dermatite atópica [11]. A tabela 2.1. mostra exemplos de condições alérgicas específicas induzidas por alimentos, tendo como base a fisiopatologia.

Existem várias reacções adversas que não envolvem uma resposta imune, e que não são por isso consideradas como alergias alimentares [9]. Incluem-se desordens metabólicas, nomeadamente a intolerância à lactose e ao álcool, respostas a componentes alimentares com actividade farmacológica (com destaque para a cafeína) ou doenças que decorrem de uma resposta a toxinas microbianas ou químicas [6]. Algumas respostas psicológicas ou

neuroológicas, tais como a aversão a alimentos ou a rinorreia, provocadas por especiarias, podem imitar as alergias mas não são consideradas desordens alérgicas [11].

Tabela 2.1. - Condições alérgicas específicas induzidas por alimentos (adaptado de: [11]).

Patologia	Desordem	Características- chave	Alimentos causais comuns
Mediadas por IgE (sintomas agudos)	Urticária aguda/angioedema	Alimentos provocam geralmente reacções agudas (20%), mas raramente urticárias crónicas.	8 Principais alergénios (leite de vaca, ovo, trigo, soja, amendoim, frutos de casca rija, peixe e marisco/crustáceos e moluscos)
	Urticária de contacto	Contacto directo com a pele resulta em lesões. Raramente é devido à libertação directa de histamina (não imunológica).	Múltiplos
	Anafilaxia	Rápida progressão, reacção multisistémica dos órgãos, pode incluir o colapso cardiovascular.	Qualquer, mas geralmente o amendoim, frutos de casca rija, marisco, peixe, leite e ovo
	Associada ao alimento, anafilaxia induzida pelo exercício.	Os alimentos despoletam a anafilaxia apenas se a ingestão é seguida temporariamente de exercício.	Trigo, marisco e aipo ma maioria dos casos
	Síndrome de alergia oral (OAS) (síndrome alérgica ao alimento associado ao pólen)	Prurido e edema leve confinados à cavidade oral e avanço não comum para além da boca (~ 7%), raramente a anafilaxia (1 - 2%). Pode aumentar após a época do pólen.	Frutas/vegetais crus; formas cozinhadas toleradas; ex: bétula (maçã, pêssego, pêra, cenoura), ambrósia (melão)
	Hipersensibilidade gastrointestinal imediata	Vómitos imediatos, dor.	Principais alergénios
Combinadas por IgE e células (sintomas tardios/crónicos)	Dermatites atópicas	Associadas a alergias alimentares em 35% das crianças com erupções cutâneas, de leves a graves.	Principais alergénios, particularmente o ovo e o leite
	Esofagites eosinofílicas	Sintomas poderão incluir desordens de alimentação, sintomas de refluxo, vómitos, disfagia e impacção alimentar.	Múltiplos
	Gastroenterites eosinofílicas	Variam consoante o local/grau de inflamação eosinofílica; pode incluir ascite, perda de peso, edema, obstrução.	Múltiplos

Alergénios Alimentares: Um Estudo Sinóptico

Patologia	Desordem	Características- chave	Alimentos causais comuns
Mediadas por células (sintomas tardios/crónicos)	Síndrome das enterocolites induzidas por proteínas alimentares	Em primeiro afecta bebés; exposição crónica: vómitos, diarreia, mau crescimento, letargia; re-exposição após restrição: vómitos, diarreia, hipotensão (15%), 2 h após ingestão.	Leite de vaca, soja, arroz, aveia, carne
	Proctocolites alérgicas induzidas por proteínas alimentares	“ <i>Mucus-laden</i> ”, fezes com sangue em recém-nascidos.	Leite de amamentação
	Dermatites de contacto alérgicas	Muitas vezes ocupacionais por causa do contacto com os químicos e oleorresinas. A dermatite sistémica é uma variante rara derivada da ingestão.	Especiarias, frutas, vegetais
	Síndrome de <i>Heiner</i>	Infiltrações pulmonares, insuficiência de crescimento, anemia por deficiência de ferro.	Leite de vaca

(Cont.)

2.2. Prevalência

Segundo a *WAO* (2013), 220-250 milhões de indivíduos poderão sofrer de alergias alimentares. Neste contexto, subsiste um impacte significativo ao nível sócio-económico, a par de uma acentuada debilidade na qualidade de vida dos pacientes, principalmente as crianças, (sendo a respectiva incidência, muitas vezes mortal, e correspondendo a 5-8 % nas crianças e 1-2 % nos adultos) [12]. De acordo com a Academia Europeia de Alergologia e Imunologia (EAACI), cerca de 17 milhões de pessoas sofrem de alergias alimentares na Europa, prevalecendo manifestações desta patologia em 5-6% das crianças (nos adultos apenas 3 - 4%). Acresce ainda que uma em cada quatro crianças europeias, em idade escolar, revela problemas alérgicos. As anafilaxias provocadas por estas alergias estão a aumentar na população mais jovem. De facto, apesar de subdiagnosticada, os dados epidemiológicos mostram uma incidência de anafilaxia na Europa em 1,5 - 8 indivíduos por 100,000 pessoas/ano, a par de um progressivo aumento do número de casos nos últimos 20 anos. A nível mais geral aponte-se ainda que a sua prevalência na Europa está estimada em 0.3%, considerando-se a sua morbilidade subestimada [13]. Entre 1997 e 2008, a prevalência das alergias alimentares aumentou 18%. Estes dados também são indicados pelo Centro de Controlo de Doenças (CDC) nos EUA, onde no mesmo período se registou um aumento de 18% nas crianças, estando afectadas na altura 3,9% [14]. Paralelamente, em 2011, também se constatou que na população australiana, em crianças até 12 meses de idade, ocorreram taxas de prevalência de 3% para o

amendoim, 8,9% para o ovo e 0,8% para as sementes de sésamo [15]. A tabela 2.2. (Anexo I) apresenta alguns rácios estimados das principais alergias alimentares. Note-se contudo que 80 - 90% das crianças superam as suas sensibilidades até aos 3-5 anos. Neste enquadramento também se tem verificado que enquanto as alergias infantis envolvendo ovo, leite de vaca, soja e trigo, tendem a desaparecer na sua maioria, as alergias aos frutos de casca rijas, legumes, peixe e marisco/crustáceos tendem a perdurar durante toda a vida do indivíduo [16]. Aponte-se ainda que a grande maioria das reacções alérgicas é provocada por este grupo de oito alimentos genéricos, nomeadamente em cerca de 90% dos casos registados [17].

Zuidmeer et al. [18] reviram a prevalência das alergias alimentares de origem vegetal onde se incluem os frutos, vegetais, legumes, frutos secos, trigo, cereais, a soja e as sementes. As análises foram baseadas na autopercepção, resultados de testes cutâneos e de desafios orais. Entre seis estudos que incluíam os desafios orais, a prevalência variou de 0,1% a 4,3% para as frutas e os frutos secos; de 0,1% a 1,4% para os vegetais; foi inferior a 1% para o trigo, soja e sésamo. Entre os estudos que incluíram os sintomas reportados pelos pacientes, ou os resultados dos testes cutâneos, a prevalência variou entre 0 - 4,2% para as frutas, incidiu em torno de 2,7% para os vegetais/legumes, atingiu 4,5% para os frutos secos, correspondeu a 1,2% para o trigo e circunscreveu-se a 0,6% para a soja.

Alguns estudos [19] desenvolvidos para descobrir as causas da prevalência crescente e da persistência das AAs, centrados no amendoim, consideraram as hipóteses da higiene, alterações nos componentes da dieta (antioxidantes, gorduras e outros nutrientes como a vitamina D), o uso de antiácidos, o processamento alimentar (tal como no amendoim torrado e na emulsificação para produzir a manteiga de amendoim, comparando com o amendoim frito ou cozido) e da exposição oral demasiado tardia, aumentando assim a exposição tópica aos alérgenos (possivelmente a sensibilizante) em relação à oral (possivelmente a tolerante).

Em relação a Portugal, não existem dados actualizados sobre a sua epidemiologia, porém um estudo realizado na população pediátrica e acompanhada nas consultas de imunoalergologia do Hospital Dona Estefânia/Lisboa registou uma prevalência de 8,5% nas idades compreendidas entre 0 - 18 anos, sendo o ovo, o leite, o peixe, os crustáceos, o amendoim, os frutos frescos e secos os principais alérgenos [20]. Atente-se contudo que de modo geral, na população pediátrica, se prevê que estes valores sejam inferiores, nomeadamente no caso da proteína do leite de vaca, sendo o alérgeno etiológico alimentar mais frequente nos grupos etários até aos 2 anos, afectando cerca de 2-3% das crianças no primeiro ano de vida [21]. Acresce ainda que aproximadamente 50% dos pacientes com alergia à proteína do leite de vaca (APLV) desenvolvem frequentemente alergias a outros alimentos [22]. Entre os pacientes com APLV, 10% parecem ainda apresentar sensibilidade à carne bovina, embora apenas 0,1 - 1% desenvolvam alergia a este alimento, nomeadamente à albumina sérica bovina [22]. Os

alimentos normalmente responsáveis pelas AAs em crianças são o leite de vaca, o ovo de galinha, o trigo e a soja, às quais 85% das crianças adquire tolerância até aos 5 anos de idade. Contrariamente, no caso do amendoim, nozes (frutos secos) e marisco, estas não são geralmente superadas [23]. As AAs mais comuns são o leite de vaca, ovo, amendoim e frutos de casca rija, como as nozes (conhecidos por “frutos secos”), peixe, marisco, trigo e soja, sendo estes alimentos responsáveis por 90% das reacções, sendo a mais frequente a do leite de vaca [24].

2.3. Epidemiologia: para além da prevalência

A Epidemiologia, que enquadra o estudo dos padrões de saúde pública e dos factores associados ao nível da população, vem apontando novas hipóteses sobre os factores de risco de uma AA [7].

Nesta perspectiva, Lack [19] reviu os factores de risco epidemiológicos, onde incluiu os riscos genéticos (associações familiares, *human leukocyte antigen* (HLA) e genes específicos), associações com atopias (nomeadamente, dermatite atópica), tempo de exposição, via de exposição (com destaque para a exposição tópica/respiratória que pode ser sensibilizante), consumo reduzido dos ácidos gordos polinsaturados ω -3 e a higiene. Colateralmente, o uso dos medicamentos anti-ácidos que alteram a digestão e poderão permitir um aumento da exposição imune às proteínas ingeridas também vem sido apontado como factor de risco [25]. Vassallo e Camargo [27] analisaram ainda os mecanismos envolvendo a vitamina D, considerando a hipótese desta entidade química ser responsável pela evolução de alergias e sensibilizações alimentares.

As diferenças raciais e étnicas ainda não foram exploradas extensivamente, contudo a alergia ao marisco parece ter uma taxa maior entre os indivíduos afro-americanos em relação aos caucasianos (3,1% e 1,8%, respectivamente) [28]. Uma AA também parece constituir um risco acrescido em asmáticos, particularmente em jovens do sexo masculino [29] e em adultos do sexo feminino [28]. A obesidade também parece incrementar o risco de ocorrência de AA [30]. Acresce ainda que um atraso na exposição a alimentos alergénicos na infância e no primeiro ano de vida poderá também constituir um factor de risco [31], ainda que todas as implicações das exposições no útero, durante a lactação e após o parto, continuem a ser áreas de controvérsia e investigação [32]. A tabela 2.3. apresenta um conjunto de observações sobre as AAs verificadas em estudos epidemiológicos da população em geral, muito embora se considere que ainda são necessários ensaios clínicos controlados para determinar as relações de causa-efeito [7].

Tabela 2.3. - Observações sobre as alergias alimentares (ou de outras doenças atópicas) verificadas em estudos epidemiológicos da população em geral (adaptado de: [7]).

Factor de Risco	Observações (exemplos)
Genéticos	Riscos crescentes para irmãos, antígeno leucocitário humano (HLA), genes específicos
Sexo	Risco acrescido para rapazes, possivelmente mulheres
Doença atópica associada	Dermatite atópica, alergias alimentares com comorbidade; asma para reacções de severidade acrescida.
Via de exposição	A falta de exposição por ingestão, durante o período de exposição ambiental, pode aumentar o risco.
Ingestão maternal	Controvérsia sobre a ingestão maternal de alérgenos durante a gravidez/lactação como factor de risco
Ingestão do alérgeno pelas crianças	Estudos recentes que suportam a ingestão inicial de alérgenos como protectora.
Constituintes diários	Perfil de ácidos gordos pode ser um risco/protector.
Vitamina D	Pode ser protectora
Obesidade	Pode ser factor de risco (estado inflamatório)
Hipótese da higiene	Risco acrescido nas cesarianas, na toma de antibióticos; risco reduzido para irmãos, com cuidados de assistência à criança, cuidados com os animais domésticos e das quintas.
Raça/Etnia	Não-caucasianos poderão ter risco.
Geografia/Dieta	Exposição ao pólen pode provocar diferentes riscos; diferenças nas dietas (ex: consumo de amendoim torrado em vez do cozido).

(Cont.)

2.4. Fisiopatologia

2.4.1. Mecanismos imunológicos

As alergias alimentares envolvem principalmente reacções mediadas por IgE, embora as não mediadas por IgE, tais como as reacções de IgE mais IgG ou as do complexo imune (IgE + outra célula), também possam ocorrer (figura 2.1). Por exemplo, em alguns casos de alergias alimentares ao leite de vaca as reacções são mediadas pela IgG; as reacções do complexo imune também são causadas pela combinação de antígenos com os anticorpos IgE, IgG e/ou IgA. Devido à respectiva predominância, descreve-se a seguir o mecanismo das reacções mediadas por IgE [33].

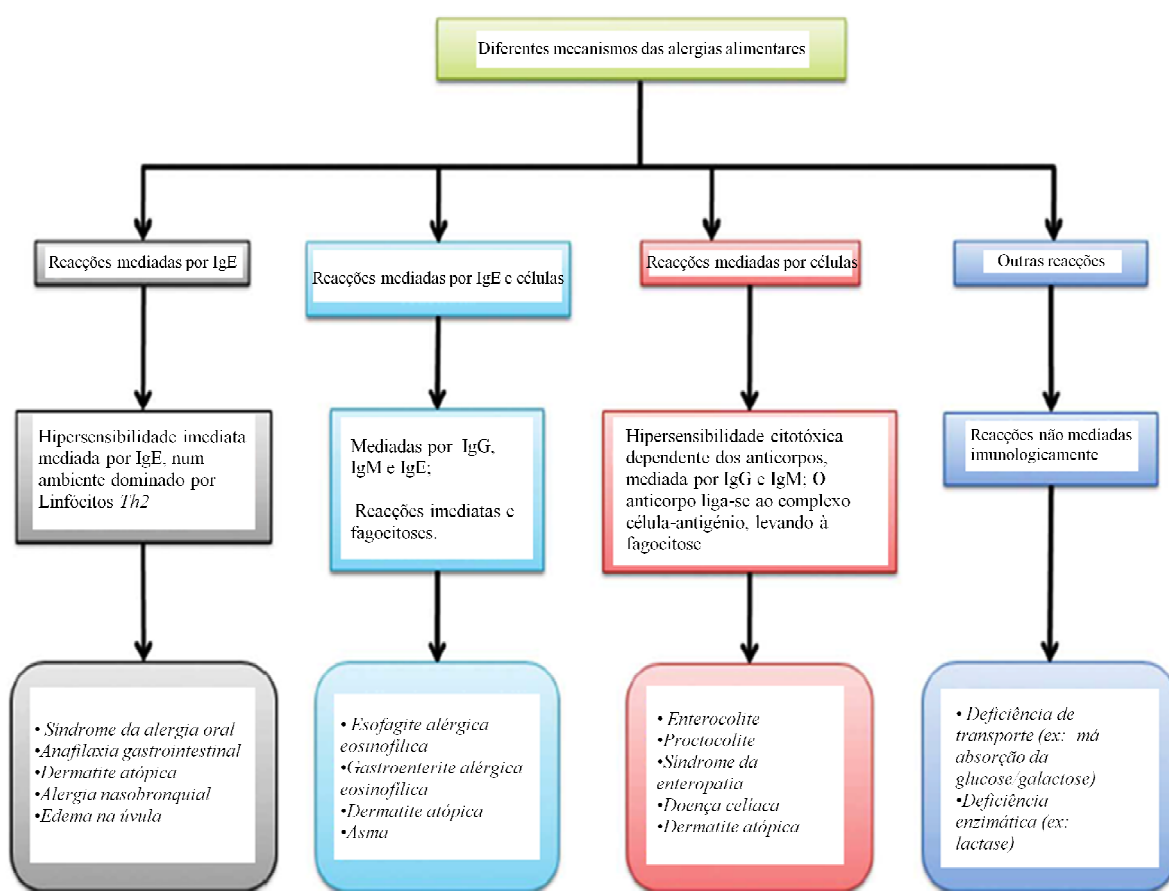


Figura 2.1. – Diferentes tipos de reacções alérgicas (adaptado de: [33]).

Reacções mediadas por IgE

As reacções mediadas por IgE mais fáceis de diagnosticar porque tendem a prevalecer. Estas (tipo I) também são conhecidas como as reacções de hipersensibilidade imediata ou anafilaxia, porque os sintomas aparecem no intervalo compreendido entre um minuto a algumas horas após a ingestão dos alimentos agressores [33]. Estas ocorrem de forma sequencial, tal como é descrito na figura 2.2.

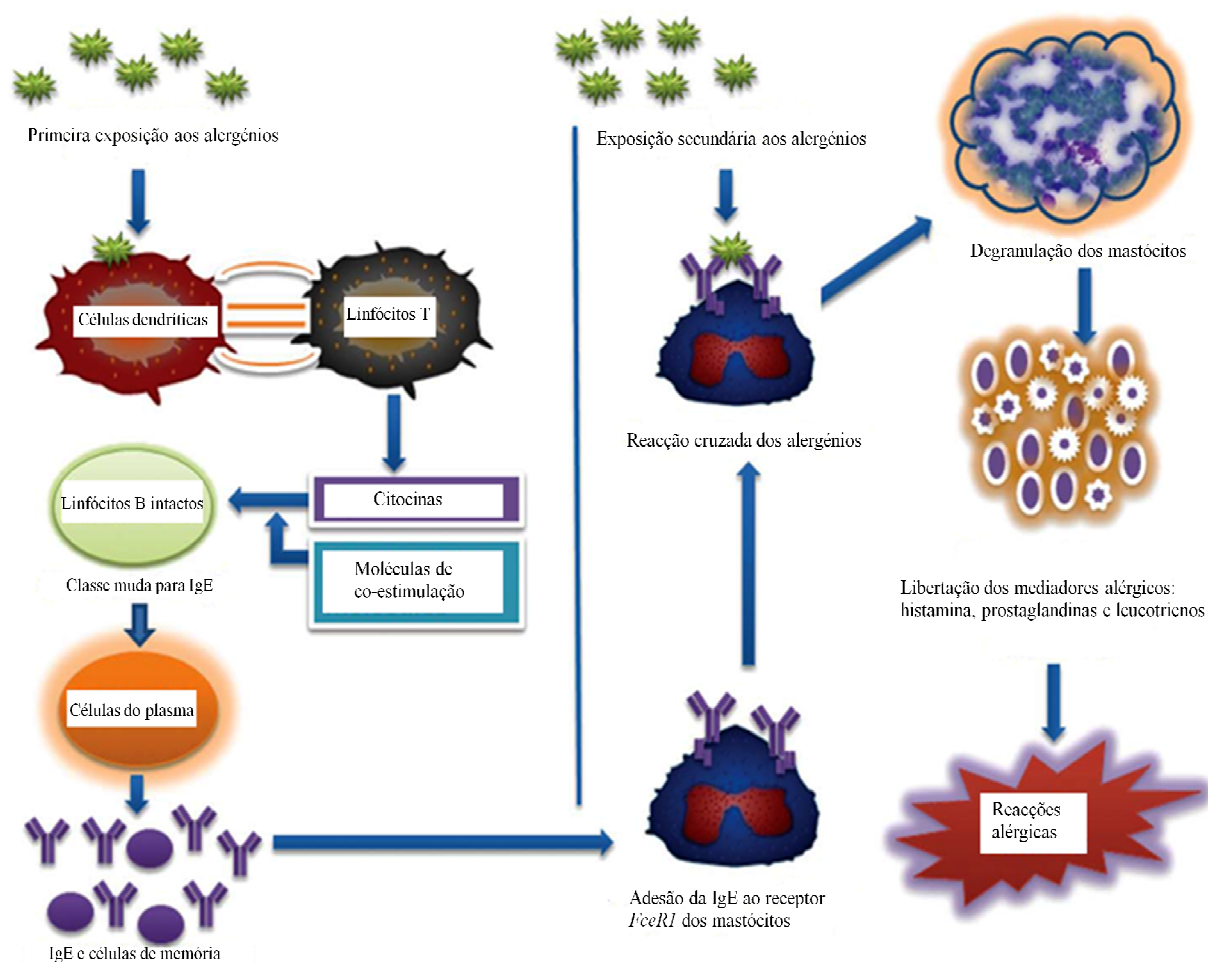


Figura 2.2. – Mecanismo da reacção imunológica mediada pela imunoglobulina IgE (adaptado de: [33]).

Primeira exposição aos alérgenos

Após uma exposição inicial do organismo do ser humano aos alérgenos, estes são capturados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) e subsequentemente degradados em fracções peptídicas. Estes peptídeos são então apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II), que estão localizadas nas células receptoras dos antígenos (células dendríticas). Os complexos MHC-II-fragmentos peptídicos são reconhecidos pelas moléculas aglomeradas de diferenciação-4 ($CD4^+$) presentes na superfície dos linfócitos *T* *helper* 2 (*Th2*). As células *Th2* activadas secretam citocinas como a interleucina-4 (*IL-4*) e a interleucina-13 (*IL-13*). Estas citocinas e alguns factores co-estimuladores [33] provocam mudança de classe nas células B virgens para IgE e células de memória. A abundância das células produtoras de *IL-4* nas biópsias brônquiais e na periferia dos indivíduos atópicos com

IgE específicas para os aeroalergénios ambientais ilustra o envolvimento deste subconjunto funcional de linfócitos *Th2* ($CD4^+$) em doenças alérgicas [33].

Adesão das IgE aos mastócitos ou basófilos

A IgE adere ao receptor ***FcεR1*** dos mastócitos ou basófilos. Os mastócitos tendem a predominar entre os tecidos, enquanto os basófilos se movem livremente no sangue. O *FcεR1*, um receptor de IgE nos seres humanos, possui quatro subunidades (α , β , $\gamma1$, $\gamma2$). A subunidade α está envolvida na ligação à IgE, enquanto que as β , $\gamma1$ e $\gamma2$ participam no processo de fosforilação, o qual induz um conjunto de sinais mediados pela quinase-tirosina após a exposição secundária ao mesmo alergénio [33].

Segunda exposição aos alergénios e degranulação dos mastócitos

A exposição secundária ao mesmo alergénio provoca a reactividade cruzada do complexo IgE-*FcεR1*. Este processo provoca então reacções mediadas pela quinase-tirosina não intrínseca, o que causa a mobilização do ião cálcio, que facilitam a desgranulação dos mastócitos ou basófilos [33].

Libertação dos mediadores celulares e sintomas alérgicos

As prostaglandinas, citocinas, leucotrienos, a histamina e outros mediadores são segregados pelos mastócitos ou basófilos degranulados. Estes agentes químicos mediadores podem causar dilatação do músculo liso, rompimento capilar, inchaço local e outros sintomas alérgicos. Em alguns indivíduos, estas reacções podem ocorrer vigorosamente levando à anafilaxia [33].

2.4.2. Sintomas e severidade

A probabilidade de uma AA ocorrer está relacionada com a quantidade de IgE disponível. Os sintomas que são descritos na tabela 2.4.2.1 podem ocorrer num período que pode oscilar entre alguns minutos a algumas horas após a ingestão de um alimento, podendo no limite ser fatal. A severidade varia em função da quantidade ingerida, co-ingestão de outros alimentos e sua preparação (cozinhados, crus ou processados) [9]. Também pode ser influenciada pela idade do paciente e pela rapidez de absorção, que por sua vez pode ser influenciada pelo momento da

ingestão, se foi de estômago vazio ou próximo do exercício físico. A presença de outras condições de co-morbidade, tais como a asma ou a dermatite atópica, também a podem influenciar. A severidade não pode ser correctamente prevista pela severidade das reacções anteriores, pela quantidade de IgE ou pelo tamanho do inchaço do teste cutâneo *skin prick test* (SPT) [42].

As reacções mais severas envolvem o sistema respiratório e o cardiovascular, o que pode levar à perda de consciência, asfixia, choque ou morte. A anafilaxia é uma reacção alérgica multissistémica que requer uma intervenção médica imediata. Neste contexto, o tipo mais grave de anafilaxia é denominado de choque anafilático e surge poucos minutos após a ingestão do alimento, manifestando-se por cianose, taquicardia e hipotensão [43]. Neste enquadramento, as crianças até aos 3 anos são as mais afectadas, pois a respectiva barreira intestinal é ainda deficiente, permitindo a passagem de macromoléculas para o interior do organismo sem digestão prévia [44]. Nos pacientes com dependência alimentar ou anafilaxia induzida por exercício, se a reacção ocorre, depende ainda do tempo decorrido entre o consumo do alimento e o exercício (cerca de duas horas) [11].

Os alimentos potencialmente mais letais são os amendoins e os frutos secos, associados a um tratamento tardio com epinefrina (adrenalina), situação que tende a ocorrer com maior frequência nos adolescentes e crianças com asma e uma AA previamente diagnosticada [45]. Paralelamente, os alimentos que provocam com mais frequência a hipersensibilização e os sintomas associados são o leite e os ovos (maioritariamente nas crianças), o marisco, peixe e carne, os cereais em grão e as farinhas, os amendoins, vegetais verdes e frutos como o melão e as uvas, café e chá [46].

Segundo Lidon e Silvestre [44], os alimentos alérgicos mais comuns são a soja, o cacau, o trigo, o amendoim e as nozes. Acrescem ainda o chocolate, os tomates, os espinafres, os morangos, os ovos, peixes, mariscos, o ananás e as especiarias (com destaque para a canela), que actuam directamente nos mastócitos e provocam a libertação de histamina. Acrescentam ainda estes autores que o vinho, a couve fermentada, o atum, a pimenta, o queijo, o arenque, as bananas, a cavala e o bacalhau, entre outros tantos, contêm histamina e outros mediadores que causam os sintomas referidos. Outros factores que podem provocar as reacções fatais são a associação da alergia à asma, ausência de sintomas de pele, negação dos sintomas pelo paciente, ingestão de álcool ou à dependência de anti-histamínicos orais para gerir os sintomas [9].

Existem muitas doenças provocadas pelas AAs, onde se incluem a rinite alérgica, bronquite asmática, dermatite atópica e distúrbios gastrointestinais, entre outras. Além disso, a prevalência alérgica de cada pessoa varia significativamente consoante a disposição genética e os factores ambientais, o que pode tornar uma pessoa alérgica a uma proteína, mas não a outra.

As doenças atópicas têm sido reportadas devido à ingestão de alimentos tais como o amendoim, soja, feijão vermelho, lentilhas vermelhas e verdes, ovos e peixe, entre outros [33].

Embora com menos frequência, alguns indivíduos são alérgicos a mais do que um alimento, sofrendo portanto de AA múltipla. Em alguns casos, para além dos alimentos diretamente implicados nas reações, ocorrem manifestações perante a exposição a outros alergénios alimentares ou mesmo a aeroalergénios. Este fenómeno constitui uma reactividade cruzada e surge devido às semelhanças estruturais moleculares entre compostos. Por exemplo, a alergia ao marisco, nomeadamente ao camarão, está associada à alergia a ácaros; a alergia ao pólen de gramíneas pode estar associada à sensibilização ao tomate [24].

Asma nasobronquial e rinite alérgica

A asma nasobronquial e a rinite alérgica são as duas complicações mais comuns que ocorrem durante um ataque alérgico. Frequentemente observam-se casos de desenvolvimento de asma e sintomas nasais em simultâneo. Os pacientes que sofrem destas condições irão sofrer ataques de asma severos e necessitam de medicação mais forte para tratar a asma. Dentro dos alimentos potencialmente causadores temos o amendoim, soja, lentilhas vermelhas e verdes e o feijão vermelho [33].

Dermatite atópica

O eczema alérgico de contacto é uma reacção que provoca prurido vermelho onde a pele entrou em contacto com os alergénios. É uma doença de pele muito comum, muitas vezes crónica, que afecta uma proporção acentuada da população mundial. É também chamada de eczema, dermatite ou atopia. O termo refere-se às doenças atópicas que são hereditárias, tendem a desenvolver-se nas famílias e muitas vezes ocorrem em conjunto. A pele fica extremamente irritada e inflamada, causando vermelhidão, inchaço, cortes, choro, crostas e descamação. Esta doença acompanha frequentemente asma, alergias ou a febre do feno e eczemas. Alguns alimentos que podem causar esta patologia são o ovo, trigo, leite e a soja [33].

Síndrome de alergia oral (OAS)

A OAS é uma reacção alérgica aos alimentos circunscrita aos lábios, boca e garganta. Os principais sintomas incluem o prurido e inchaço/edema destas zonas. Estes começam geralmente minutos após a ingestão e estabelecem-se dentro de uma hora. É provocada pela reactividade cruzada entre as proteínas das frutas e dos vegetais frescos e as do pólen.

Geralmente ocorre em pacientes que também são alérgicos ao pólen. Estas proteínas são facilmente degradadas pelo cozimento ou processamento. Logo, a alergia não ocorre a partir da ingestão de frutos e vegetais, nem cozidos nem processados. O kiwi é uma das causas mais comuns desta síndrome. Embora os pacientes se apresentem muitas vezes com síndromes leves, as reações sistémicas severas não são incomuns, particularmente em crianças. Alguns alimentos que causam a OAS são as frutas cruas, tais como a maçã, pêssago, ameixa, pera, tomate, melão, banana, cereja e os legumes pepino e cenoura, assim como também a amêndoa e a avelã [33].

Esofagite eosinofílica

É uma condição inflamatória na qual a parede do esófago é preenchida por um grande número de eosinófilos. Embora as causas da esofagite sejam desconhecidas, as respostas alérgicas têm sido implicadas. A sua causa mais comum é o refluxo ácido, que normalmente resulta em azia, embora o refluxo ácido também possa causar úlceras no revestimento interno do esófago. Os alimentos envolvidos na sua indução são o ovo, leite e a soja. Estes são frequentemente identificados mediante recurso a testes cutâneos *SPT* [33].

Edema da úvula

A úvula é um pequeno órgão da cavidade oral ligado ao palato suave. Está envolvido na articulação da voz humana e na deglutição e impede a entrada de alimentos na cavidade nasal. O seu inchaço ocorre em diferentes patologias, tal como na AA. Normalmente o edema manifesta-se na totalidade da orofaringe, ocorrendo dificuldade na fala e na respiração, e, visto que afecta as cordas vocais, provoca a evolução de disfonia. O marisco e moluscos, as avelãs e as nozes são alguns exemplos que podem induzir este edema [33].

Estomatite aftóide recorrente (RAS)

A RAS é uma das lesões orais mais comuns, sendo provocada pelo leite, glúten e outros alérgenos. Pode ocorrer de forma simples ou múltipla na mucosa oral. Esta condição crónica e incurável pode ser dolorosa para o paciente, dificultando o acto de falar, comer ou beber. Pode ser causada por diversos produtos alimentares (apresentando deficiência em vitamina B12, ferro e ácido fólico) [33].

Síndrome da enterocolite induzida por proteínas alimentares

O síndrome da enterocolite induzida por proteínas alimentares é uma hipersensibilidade gastrointestinal provocada por alimentos, não mediada pela IgE [33].

Vómitos, seguidos de um aumento do número de leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico, diarreia, e, possivelmente, letargia e hipotensão são sintomas característicos desta enterocolite. O arroz é o alimento sólido que normalmente provoca esta síndrome [33].

Diarreia neonatal

A diarreia é a principal responsável pela mortalidade pediátrica em todo o mundo. As diarreias provocadas pelo leite de vaca e por outros alimentos são muito recorrentes nas crianças. O seu início pode rapidamente levar a uma desidratação fatal e subnutrição. O leite, a soja e os grãos constituem alguns exemplos [33].

Tabela 2.4. – Sintomas das reacções alérgicas induzidas por alimentos (adaptado de: [11]).

Orgão-alvo	Sintomas imediatos	Sintomas tardios
Cutâneo	Eritema	Eritema
	Prurido	Vermelhidão
	Urticária	Prurido
	Erupção morbiliforme	Erupção morbiliforme
	Angioedema	Angioedema
Ocular		Erupção cutânea eczematosa
	Prurido	Prurido
	Eritema conjuntival	Eritema conjuntival
	Lacrimar	Lacrimar
	Edema periorbital	Edema periorbital
Sistema respiratório superior	Congestão nasal	
	Prurido	
	Rinorreia	
	Espirrar	
	Edema da laringe	
	Rouquidão	
	Tosse seca	
Sistema respiratório inferior	Tosse	Tosse, dispneia e pieira
	Aperto no peito	
	Dispneia	
	Pieira	
	Retracções intercostais	
Gastrointestinal (oral)	Uso da musculatura acessória	
	Angioedema dos lábios, língua ou do palato	
	Prurido oral	
	Inchaço da língua	

Orgão-alvo	Sintomas imediatos	Sintomas tardios
Gastrointestinal (inferior)	Náuseas	Náuseas
	Dor abdominal de cólicas	Dor abdominal
	Refluxo	Refluxo
	Vómitos	Vómitos
	Diarreia	Diarreia
		Hematoquezia
		Irritabilidade e recusa de alimentação com perda de peso (crianças pequenas)
Cardiovascular	Taquicardia (ocasionalmente bradicardia em anafilaxia)	
	Hipotensão	
	Tonturas	
	Desmaios	
	Perda de consciência	
Variados	Contrações uterinas	
	Sensações de ansiedade e medo	

(Cont.)

2.5. Alergénios e alimentos alérgicos

Os alergénios alimentares são normalmente glicoproteínas solúveis em água, com pesos moleculares oscilando entre 10-60 kDa, estáveis a pH ácido (~ 2-5) [58]. A grande maioria pode provocar reacções quando ingeridos na forma crua ou depois de cozinhados ou digeridos, no entanto, alguns, tais como os das frutas e vegetais, causam reacções principalmente se ingeridos crus [11]. Por outro lado, o aquecimento pode aumentar a alergenicidade de certas proteínas através da indução de modificações covalentes, que conduzem a novos antígenos ou a uma estabilidade melhorada [59].

Também podem provocar reacções se as proteínas forem inaladas, embora tal deva ser diferenciado da simples inalação da fragrância de um alimento, o que não causa reacções alérgicas. A reactividade cruzada ocorre quando um alergénio alimentar tem similaridade estrutural ou sequencial com um outro diferente ou um aeroalergénio. A probabilidade de se apresentar uma reacção clínica a estes compostos é altamente variável e depende do tipo de alimento. Por exemplo, estas reacções entre os legumes não são muito comuns (de facto, a maioria das pessoas alérgicas ao amendoim toleram os feijões e as ervilhas), enquanto que entre os diferentes tipos de marisco ou crustáceos já são muito vulgares [11].

Existem preocupações em relação à alergenicidade dos alimentos geneticamente modificados. As modificações genéticas podem introduzir uma proteína alérgica conhecida, criar novos alérgenos ou sobreregular a expressão de potenciais alergénios. Isto tem aumentado

os estudos sobre os produtos resultantes de manipulações genéticas e sobre a sua regulação na produção [60].

Embora qualquer alimento possa desencadear uma resposta alérgica e mais de 170 alimentos tenham sido identificados como causadores de reacções mediadas por IgE, é apenas uma minoria destes que causa a maioria das reacções, sendo a maior parte atribuída aos principais alergénios dos amendoins, frutos de casca rija, ovos, leite, peixe, marisco e crustáceos, trigo e soja [9].

O aipo, mostarda, gergelim, tremço e os moluscos foram identificados como alergénios significativos nos países europeus e no Japão o trigo mourisco também é comum [61]. Os aditivos e os corantes alimentares tais como o anato, carmim e a gelatina, que contenham proteína, podem induzir reacções alérgicas. Os aditivos químicos, tais como os aromatizantes/corantes (por exemplo a tartrazina) e os conservantes (com destaque para os glutamatos e sulfitos), poderão provocar reacções adversas, embora o mecanismo imune ainda não tenha sido identificado e, como tal, são classificadas como intolerâncias [11]. Note-se que a conservação de proteínas através das espécies constitui um risco para os pacientes com estas patologias [62]. Assim, existem duas classes genéricas de alergénios alimentares. Na classe I encontramos as glicoproteínas termoestáveis, resistentes ao meio ácido e à proteólise, que induzem a sensibilização através do trato gastrointestinal, podendo causar anafilaxias. São mais comuns nas crianças, incluindo-se por isso as alergias ao leite de vaca, ovo de galinha, amendoim, peixe e marisco, entre outras. A classe II corresponde às proteínas inaladas pela via respiratória, como o pólen da bétula, tendo reactividade cruzada através de epítomos homólogos de alergénios de origem vegetal tais como as frutas e os vegetais crus.

Alergia às proteínas do leite de vaca (APLV)

A APLV ocorre maioritariamente nas crianças com uma predisposição genética, afectando significativamente o seu bem-estar. Isto é provocado pelo desmame precoce do leite materno e pela introdução precoce do leite de vaca na alimentação do bebé [63].

O leite materno estimula o crescimento e a nutrição adequada, conferindo protecção contra doenças e infecções. A aleitação no seio deve ser exclusiva nos primeiros quatro a seis meses de vida e complementada até aos dois anos de idade. O número de crianças amamentadas tende a ser complementada de forma precoce de outros tipos de leite. Assim, o leite de vaca é o mais usado como substituto do leite materno, o que faz com que as suas proteínas sejam os primeiros antigénios alimentares com os quais o lactente contacta [63].

Os factores que mais contribuem para esta alergia são a predisposição genética, a permeabilidade da barreira do trato gastrointestinal e a imaturidade fisiológica do sistema imunológico e do aparelho digestivo, próprias dos bebés até aos 2 anos de vida [64].

A alergenicidade do leite de vaca pode ser reduzida pelos diferentes tratamentos do processamento do leite. Por esta razão, alguns indivíduos alérgicos conseguem tolerar os produtos lácteos evaporados ou esterilizados mas não os pasteurizados. Outros processos lácteos tais como a digestão enzimática também podem reduzir o potencial alérgico das proteínas do soro do leite. Nos produtos fermentados, tais como os iogurtes e os queijos, a estrutura proteica permanece praticamente inalterada e, portanto, eles conservam a sua alergenicidade [65]. A sua prevalência corresponde a 2 - 3% nas crianças até aos 3 anos, sendo de 0,3% nos adultos, apresentando uma vasta gama de síndromes clínicas mediados e não mediados por IgE, ou de forma mista [63].

Segundo Host [66], 56% das crianças até 1 ano apresentam reversão dos sintomas, aos 3 anos 87% e aos 15 anos 97%. Acresce que as crianças diagnosticadas até aos 5 anos como alérgicas tendem a apresentar evolução positiva em 80% a 90% dos casos. No entanto, mesmo aquelas que adquirem tolerância tendem a revelar tendência para o aparecimento de asma, rinite ou dermatite.

As reacções mediadas por IgE, como apresentam manifestações rápidas (até 30 minutos após a ingestão do leite), com a formação dos anticorpos específicos, são de fácil diagnóstico. As não mediadas provocam sintomas tardios, podendo aparecer horas ou dias após a ingestão [67]. As reacções mistas são provocadas pela IgE e pelos Linfócitos T e citocinas pró-inflamatórias [63].

As reacções por IgE costumam apresentar-se com respostas imediatas, nomeadamente a urticária e um angioedema, embora anafilaxias graves possam também ocorrer e eventualmente mortes. Algumas destas podem acontecer com a ingestão de pequenas quantidades de leite ou com o simples contacto. Esta alergia pode apresentar-se por reacções não mediadas por IgE, tais como a dermatite atópica ou desordens gastrointestinais eosinofílicas. Cerca de 50% dos pacientes frequentemente desenvolvem alergias a outros alimentos e cerca de 80% aos aeroalergénios [4].

As reacções agudas (mediadas por IgE) são devidas a vários alergénios. As caseínas e as proteínas do soro do leite representam cerca de 80% e 20% da proteína total, respectivamente. As caseínas incluem as α 1-, α 2-, β - e κ -caseínas (*Bos d 8*) e compreendem 32%, 10%, 28% e 10% da proteína total, respectivamente. Os alergénios do soro mais importantes são a α -lactoalbumina (*ALA*, *Bos d 4*) e a β -lactoglobulina (BLG, *Bos d 5*), compreendendo 5% e 10% da proteína total. Outros alergénios menores incluem a albumina do soro (*BSA*, *Bos d 6*), a lactoferrina e as imunoglobulinas (*Bos d 7*) [68].

Alguns pacientes podem tolerar pequenas quantidades de leite em produtos de pastelaria/cozidos. A tolerância ao leite desenvolve-se a partir dos 3 a 5 anos. A identificação dos epítomos específicos de ligação à IgE da caseína e das proteínas do soro explica estes fenómenos clínicos e também prevê a probabilidade de tolerância ou persistência nos pacientes [4].

A patogénese e os compostos causadores das reacções não mediadas por IgE e os processos das reacções mistas (IgE e não IgE) ainda não são bem conhecidos [68].

Após diagnóstico e respectiva confirmação é importante garantir que uma dieta saudável e equilibrada seja mantida, especialmente durante o crescimento e desenvolvimento da criança, assegurando-se uma ingestão adequada de nutrientes essenciais tais como o cálcio, as vitaminas A, D, B₂ e a B₁₂. O consumo de sardinhas e salmão enlatados e vegetais verde-escuros como os brócolos cozidos, também pode complementar uma ingestão de cálcio [65].

O diagnóstico é baseado num desafio oral (OFC) mas um historial clínico convincente e a quantificação da IgE pode corroborar ou mesmo eliminar a necessidade dos testes de OFC. Além do mais há uma escassez de testes para as manifestações não mediadas por IgE [68].

A eliminação das proteínas prejudiciais da dieta é o esteio da terapia, embora existam evidências da eficácia das novas terapias emergentes tais como a imunoterapia oral ou sublingual [68].

Um diagnóstico determina a prescrição de uma dieta de eliminação de 2 a 4 semanas. O teste de OFC não é necessário nas reacções imediatas ou gastrointestinais tardias com anemia, nos casos de crescimento deficiente ou de hipoalbuminemia se o alimento causador for o leite de vaca. As crianças podem ser testadas 6-12 meses após a reacção e não antes dos 12-24 meses de idade, consoante os sintomas. A suplementação com cálcio deve ser avaliada nas crianças alérgicas. Esta dieta não é necessária nas crianças com dermatites atópicas leves e historial negativo. As fórmulas de soja não devem ser usadas nas crianças com menos de 6 meses de vida que revelem sintomas alérgicos ou gastrointestinais tardios [67].

Apesar das questões de sensibilidade simultânea ao leite de vaca e à soja, as fórmulas à base de soja parecem constituir a melhor opção para as crianças alérgicas a este leite com reacções por IgE, especialmente acima dos 6 meses de idade. Não são adequadas na prevenção, ou como tratamento de enterocolites, sendo neste caso as fórmulas de leite extensivamente hidrolizadas (eHF) as recomendadas, devido à possível prevalência de alergia à soja [68]. Às crianças que manifestem os tais sintomas gastrointestinais e de anemia, crescimento fraco e hipoalbuminemia devem ser administradas as fórmulas de aminoácidos (AAF), transitando depois para as eHF. As eHF ou as AAF são usadas nas crianças com menos de 12 meses e nas mais velhas com os mesmos sintomas. Nas crianças que sofrem de anafilaxias e com menos de 12 meses, os substitutos do leite de vaca nem sempre são necessários [67].

O historial é favorável para a maioria das crianças alérgicas ao leite e à soja, embora a recuperação possa demorar vários anos na maioria dos casos [68].

Convém ainda fazer uma pequena menção à intolerância à lactose, visto ser um dos distúrbios alimentares que mais afecta a população mundial e as crianças, apesar de não ser uma alergia, podendo os sintomas muitas das vezes serem semelhantes e causar dúvidas no diagnóstico. Consiste então numa desordem da mucosa intestinal (intestino delgado) que impossibilita a digestão e absorção da lactose, devido à baixa actividade ou baixa produção da enzima β -D galactosidase, conhecida como a lactase. Esta hidrolisa a lactose em galactose e glucose, que em condições normais seriam absorvidas pelos enterócitos. Esta enzima está presente na superfície apical dos enterócitos nas bordas de escova intestinais com maior expressão no jejuno [69]. Na realidade, cerca de 70% da população adulta mundial não produz lactase suficiente, e, portanto, tem algum grau de intolerância à lactose. Na Europa, a deficiência de lactase está presente em 5% dos caucasianos e numa proporção muito maior (50 a 80%) nos grupos étnicos [65].

A tabela 2.5. (Anexo II) apresenta um conjunto de alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da APLV.

Ovo de galinha

A alergia à proteína do ovo é bastante comum na infância, tendo uma prevalência de 1,5% e no caso dos adultos de 0,2% [6]. A grande maioria das reacções é mediada pela IgE sendo desenvolvida a tolerância por volta dos 5 anos. Se a criança permanecer alérgica terá um risco aumentado de se tornar sensível aos aeroalergénios [4]. As reacções variam de urticária leve e de contacto, dermatites atópicas a reacções sistémicas anafilácticas [70].

Os ovos são muito usados na composição de quase todos os produtos de pastelaria. Muitos dos pacientes são capazes de ingeri-lo se cozinhado, visto que o calor e a acção enzimática, embora diminuam a sua alergenicidade (da ovomucóide e da ovoalbumina), não afectam a lisozima [70]. Note-se que este caso e o desenvolvimento da tolerância são explicados pela natureza da resposta antigénica do indivíduo [4]. Aponte-se ainda que a aplicação da vacina contra a gripe nos pacientes não é aceite com unanimidade, não sendo recomendada naqueles que tiverem um historial clínico com antecedentes de anafilaxia, devido ao risco de reacções adversas com uma vacina proveniente de culturas com embriões de galinha, que contém a ovomucóide e a ovoalbumina [70].

A clara e a gema possuem ambas alergénios relevantes, no entanto encontram-se na sua grande maioria na clara, sendo a sua composição proteica composta pela ovalbumina (54%), conalbumina (13%), ovomucóide (11%), globulinas (8%), lisozima (3,5%), ovomucina (1,5%) e

outras proteínas (<1%; flavoproteína, ovoglicoproteína, ovomacroglobulina, ovoinibidor e avidina), sendo a mais alérgica a ovomucóide [4].

A tabela 2.6. (Anexo III) apresenta um conjunto de alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia ao ovo.

Amendoim

O amendoim é um fruto muito consumido a nível mundial. Pode ser ingerido cru ou frito, como manteiga de amendoim, óleo de amendoim ou farinha (note-se que o conteúdo proteico pode atingir 30%). Esta alergia é reconhecida como uma das mais graves, devido à sua prevalência, persistência e potencial severidade da sua reacção. A sensibilidade a este fruto aparece cedo nas crianças e normalmente persiste ao longo da vida. Frequentemente, não são necessárias grandes quantidades dos respectivos alergénios para despoletar uma reacção de hipersensibilidade (apenas concentrações vestigiais). Estima-se que a alergia afecte 0,5-1,1% da população [71]. Esta alergia apenas pode ser superada em 20% das crianças em idade escolar, tendo nestas idades uma prevalência de 1% [6].

Os indivíduos alérgicos podem apresentar diversos sintomas, que vão desde a urticária leve, inchaço facial, câimbras abdominais até à hipertensão com choque anafiláctico. É a causa mais comum de anafilaxia fatal devido a alimentos [71]. Os maiores alergénios são as proteínas de armazenamento das sementes, nomeadamente as globulinas 7S e as albuminas 2S, as glicininas e as conglininas, embora tenham sido descritos 11 compostos diferentes [71]. São proteínas homólogas de outras, como as dos frutos secos, verificando-se entre 23 a 50% dos pacientes com esta alergia. A reactividade cruzada entre o amendoim e a soja é rara assim como com outros legumes [70]. O processo de torrefacção do amendoim produz produtos finais com uma resistência à digestão aumentada e com um poder alérgico superior (comparativamente com a fritura ou cozedura). Este facto parece explicar a baixa prevalência desta alergia na China, onde o amendoim é muito consumido sem ser torrado [58].

A tabela 2.7. (Anexo IV) apresenta um conjunto de alimentos a excluir para o caso da alergia ao amendoim e aos frutos de casca rija.

Frutos de casca rija

As reacções aos frutos de casca rija são muito severas e contabilizam um número significativo de óbitos. A sua prevalência mundial corresponde a 0,5-1% nas crianças e 0,6% nos adultos [6]. Foram reportadas reacções às nozes, castanha de caju, amêndoas, nozes de pecã,

castanha do Brasil, avelãs, macadâmia, pistacho e pinhão [4]. A prevalência destas alergias é similar em todo o Reino Unido [72] e a da avelã é bastante comum na Europa [73].

As sequências moleculares das várias proteínas alérgicas já foram identificadas. No geral, a maioria das reacções graves é devida às famílias das proteínas de armazenamento das sementes (semelhantes às do amendoim e de sésamo). Neste enquadramento verifica-se que os soros de alguns doentes alérgicos à avelã tendem a reagir com a *Cor a 1*, a principal proteína alérgica, que é homóloga da *Bet v 1*, o alergénio do póleno vidoeiro [74], enquanto que os pacientes que reagem severamente à avelã demonstram reacções por IgE à *Cor a 8*, uma *LTP* (*Lipid Transfer Protein*) [75]. Embora inicialmente se tenha pensado que estas alergias persistiam até à idade adulta, mais recentemente ficou demonstrado que 9% dos pacientes que tiveram reacções superaram as mesmas [76].

Os pinhões não têm sido associados a alergias graves. Adicionalmente, os grãos de cacau, como são muito transformados, sofrem desnaturação da proteína alérgica, pelo que a sua alergia é extremamente rara. Note-se contudo que outros ingredientes presentes no chocolate também podem provocar alergia tal como o côco [77].

Trigo

O trigo é uma fonte de alergénios potentes que provoca várias manifestações clínicas mediadas pela IgE. Estas manifestações incluem as alergias alimentares e respiratórias ao pólen e a sensibilização às farinhas inaladas, como uma das principais causas para a sensibilização ocorrida nos padeiros e nas pessoas que processam a farinha [78].

O trigo, sendo um dos cereais mais cultivados e processados, está associado a estas alergias tal como as intolerâncias (nomeadamente a doença celíaca - Glúten) [4]. A nível mundial, a prevalência desta alergia é de cerca de 0,4% nas crianças e de 0,3% nos adultos [6].

Os alergénios mais importantes do trigo têm sido caracterizados através de métodos bioquímicos, imunológicos e da biologia molecular. A identificação de alguns dos compostos pela IgE parece ainda estar associada com certas manifestações clínicas. Por exemplo, a gliadina ω -5 foi descrita como um alergénio associado à anafilaxia induzida pelo exercício físico, dependente da ingestão prévia, e à alergia em si. Os inibidores da α -amilase, gliadinas, proteínas de transferência de lípidos e os inibidores das proteinases com serina têm sido descritos como alergénios, que podem ser reconhecidos especificamente por pacientes que sofram de alergias respiratórias, em particular o asma dos padeiros. As tiorredoxinas e as profilinas também foram identificadas como alergénios envolvidos na alergia respiratória [78].

Também podem ocorrer outras reacções mediadas por células como a dermatite atópica, manifestações gastrointestinais e a doença celíaca [4].

Apesar do trigo ter uma reactividade cruzada elevada entre os grãos de cereais, correspondendo a 20%, os pacientes podem tolerar outros cereais, em que as manifestações clínicas decorrentes não são consideradas importantes do ponto de vista clínico. Note-se, contudo, que a maioria das crianças supera esta alergia até ao final da infância [4].

Convém também fazer uma pequena referência à intolerância ao glúten (mistura das proteínas glutenina e gliadina), um dos distúrbios alimentares que mais afecta as pessoas (1-2% da população mundial), que não sendo uma alergia, pode apresentar sintomas semelhantes. É o principal componente proteico do trigo. É uma desordem intestinal autoimune que ocorre quando o corpo não consegue tolerar e/ou digerir o glúten (também encontrado no centeio, cevada e aveia). A diferença é que envolve as imunoglobulinas IgA e IgG, ao contrário do que acontece na alergia provocada pela IgE ou pelos mastócitos. A prevalência desta doença, também designada de doença celíaca, está subestimada. Os testes serológicos identificaram a doença não diagnosticada no caso de 1 indivíduo em cada 100 na população europeia. É uma condição permanente que pode ser diagnosticada em qualquer idade. Se um paciente consome um alimento com glúten, o revestimento do intestino delgado danifica-se e torna-se menos capaz de absorver os nutrientes essenciais tais como as gorduras, proteínas, hidratos de carbono, minerais e vitaminas. Os sintomas incluem diarreia, perda de peso, fraqueza, irritabilidade e dores abdominais. Nas crianças, os sintomas de desnutrição, incluindo o crescimento deficitário, poderão ocorrer. Correntemente, o único tratamento possível para os doentes celíacos é as dietas livres de glúten [1].

A tabela 2.8. (Anexo V) apresenta um conjunto de alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia ao trigo.

Soja

Esta alergia tem um rácio de prevalência aproximado que oscila em torno de 0,4% nas crianças e 0,3% nos adultos. É comum nas crianças e nos bebés, sendo no entanto transiente até aos 3 anos. As manifestações vão desde reacções imediatas (como a urticária) até reacções não mediadas por IgE (tais como a dermatite atópica e os sintomas gastrointestinais) [4].

Muitos dos óleos vegetais derivam da soja, no entanto o óleo de soja pode ser ingerido com segurança pelos pacientes, tal como a lecitina de soja, um subproduto da soja bastante utilizado na indústria alimentar como emulsificante [4], isto porque o processo de refinação remove quase na totalidade as proteínas alérgicas. Contudo, não é certo que as restantes proteínas não possam provocar também alergia nos pacientes atópicos [79].

A tabela 2.9. (Anexo VI) apresenta um conjunto de alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia à soja.

Peixe

As reacções alérgicas aos peixes estão associadas a reacções graves e mesmo óbitos. A sua prevalência foi estimada em 0,4-0,5%. São mais comuns nos adultos do que nas crianças (0,1-0,2%) e nas mulheres do que nos homens. O prurido na boca é o sintoma mais referido e o vômito o sinal mais comum em mais de 1/3 dos pacientes [80]. Esta alergia é normalmente persistente para a vida [81]. O atum é bastante consumido e muitos dos indivíduos alérgicos são capazes de tolerar o enlatado. O bacalhau e o arenque são uma escolha popular para o peixe frito e a cavala e o salmão são também bastante consumidos. Tem sido demonstrada a reactividade cruzada entre as diferentes espécies de peixes, incluindo os de água salgada e de água doce. A parvalbumina (*Gad c1*), uma pequena proteína, é o principal alergénio do peixe, sendo extremamente resistente ao aquecimento e às enzimas digestivas. O diagnóstico destas alergias pode ser muito simples através da caracterização com a parvalbumina recombinante da carpa (*Cyp c1*), que contém a maioria dos epítomos da IgE presentes nos extractos naturais do atum, bacalhau e do salmão e reage com a IgE de todos os pacientes alérgicos que forem testados [82].

A tabela 2.10. (Anexo VII) apresenta um conjunto de alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia ao peixe.

Marisco

A prevalência desta alergia foi estimada em cerca de 2% para os adultos, sendo mais comum nestes do que nas crianças (usualmente aponta-se 0,1%) [6].

As reacções aos crustáceos como o camarão, lagosta, caranguejo e lagostim são muito comuns e potencialmente letais. São geralmente persistentes ao longo da vida. Existe bastante reactividade cruzada entre os crustáceos [83]. Contudo, não reagem de forma cruzada com os peixes ósseos. A tropomiosina, uma proteína muscular, é o principal alergénio dos crustáceos. Encontra-se nos moluscos e nos artrópodes [84, 85]. As tropomiosinas dos vertebrados não são alérgicas. Outras reacções a estes produtos incluem as reacções retardadas do trato gastrointestinal às ostras e às amêijoas. A manipulação dos frutos do mar pode causar asma e urticária.

A tabela 2.11. (Anexo VIII) apresenta um conjunto de alimentos a excluir para o caso da alergia ao marisco (crustáceos) e aos moluscos.

2.6. Diagnóstico

O diagnóstico de uma AA requer um historial clínico detalhado, um exame físico, testes *in vivo* (tais como o teste cutâneo “*Skin Prick Test*” - *SPT* e os desafios orais- *OFC*) e/ou os testes *in vitro* (como o *ImmunoCAP*, *RAST/EAST* ou o *ELISA*) que também poderão ser necessários. Os pacientes devem evitar consumir o alimento em questão até à avaliação final, sendo que um autoinjector de epinefrina deve ser prescrito, mesmo que o diagnóstico seja incerto [86].

Outras técnicas de diagnóstico compreendem os marcadores serológicos (a quantificação de histamina libertada por basófilos, a determinação dos níveis dos anticorpos séricos específicos IgG e IgG4, etc.) [87] e as provas específicas [88].

No que diz respeito ao historial clínico, é importante investigar todos os alimentos suspeitos e a preparação das refeições (nomeadamente o cozimento, se são crus, adição de especiarias e outros ingredientes). O tempo decorrido entre a exposição ao alimento até ao aparecimento dos sintomas, a duração e severidade dos sintomas, bem como a sua reprodutibilidade, no caso de exposição periódica, deve ser avaliada. Também é importante inquirir acerca de outros factores que possam potenciar a reacção alérgica como o exercício ou o álcool [86].

Em termos gerais, o historial é mais útil no caso das reacções mediadas por IgE, visto que os sintomas ocorrem logo após a ingestão do alimento e pelo número de órgãos afectados [87].

O passo inicial consiste na identificação do mecanismo que mais provavelmente causou a alergia (mediada por IgE, mista ou não mediada) e os alimentos suspeitos [58].

Um esquema geral do diagnóstico de uma alergia alimentar é apresentado na figura 2.3., que se encontra no Anexo IX.

A identificação dos alimentos suspeitos é difícil, visto que a alimentação é ingerida durante o dia e os sintomas que surgem logo após a ingestão poderão ser mal atribuídos à alergia ou ao alimento errado. Para as reacções agudas, um alimento que é ingerido ocasionalmente é provavelmente o responsável pela reacção, ao invés daquele que já foi tolerado. Além disso, as reacções são normalmente provocadas pela exposição não intencional aos alergénios já previamente identificados e não a novos compostos. É necessária investigação para identificar os possíveis alergénios nos alimentos processados e nas refeições da restauração [58].

Para as doenças crónicas, as suspeitas sobre determinados alimentos só se verificam em cerca de 30% dos casos. Os registos diários da dieta e dos sintomas são úteis mas pouco diagnosticáveis. Em alguns casos os testes invasivos como a endoscopia são necessários mas o

diagnóstico está dependente da identificação da IgE específica (ou da sua ausência) para o alimento em causa, dos resultados das dietas de eliminação e das respostas dos desafios orais [58].

Testes de diagnóstico para a IgE

Skin Prick Test

Estes testes cutâneos são usados para detectar as IgE específicas de cada alimento. Enquanto o paciente não toma anti-histamínicos durante um período de tempo, um dispositivo como uma agulha bifurcada, lanceta, sonda de plástico ou uma agulha de calibre pequeno, injecta um extracto comercial de um alimento na epiderme. Se os anticorpos estiverem presentes os mastócitos rompem e libertam os mediadores que causam os angioedemas, uma vasodilatação, uma pápula e um eritema, no prazo de 15 minutos. Os controlos positivos (histamina) e negativo (glicerina salina) garantem que a resposta imune não é bloqueada e que não existe um dermatografismo ou uma resposta a um trauma local que gere os mesmos sintomas. As crianças podem ser testadas. Alguns técnicos preferem usar extractos frescos, principalmente quando testam a sensibilidade a frutas e vegetais que são facilmente degradáveis [89]. O resultado é positivo se é gerado um inchaço com um diâmetro de 3 mm ou maior, após subtração do controlo de solução salina, uma vez que este diâmetro fornece uma sensibilidade aceitável (75-95%) e uma especificidade (30-60%) [90]. Os testes intradérmicos que usem extractos alimentares não devem ser usados porque dão um rácio de falsos-positivos inaceitável e podem despoletar reacções sistémicas (o que é raro nos testes de “prick”) [91].

RAST

O alérgeno de interesse é ligado a uma matriz sólida e exposto ao soro do paciente. As IgE específicas ligam-se ao complexo matriz-alérgeno e são detectadas através de anticorpos secundários marcados, específicos para a IgE. Os fabricantes e os substratos variam e os resultados podem ser apresentados em classes (classe de 1-5 ou 6), contagens, percentagens ou unidades arbitrárias de concentração [58].

Os testes de “prick” e os RASTs detectam a IgE mas quando a sensibilização ocorre sem as manifestações clínicas, os testes por si só não podem ser usados como diagnóstico, devendo considerar-se então também o historial clínico. Não se devem fazer painéis de testes sem o historial porque podem existir muitos resultados positivos irrelevantes. Os resultados são mais valiosos quando são negativos, uma vez que a alta sensibilidade dos testes lhes dá 95% de

precisão descontando as reacções da IgE [92]. Contudo, nas desordens crónicas, um teste positivo apenas está associado às verdadeiras reacções clínicas em 50% dos casos [93]. De facto, os testes às vezes permanecem positivos durante algum tempo, mesmo depois dos sintomas terem sido eliminados. O *RAST* é normalmente menos sensível que o teste de “*Prick*”. Nenhum dos dois resultados consegue prever o tipo e severidade da reacção [94].

De modo geral pode afirmar-se que o teste cutâneo e o *RAST* são auxiliares essenciais para se confirmarem as suspeitas de reacções agudas, excluindo determinados alimentos como causa e para um rastreio (se for feito de maneira criteriosa), para se determinar se os alimentos estão provocando uma desordem crónica mediada por IgE [58].

Aguns testes têm sido sugeridos para o diagnóstico mas nunca demonstraram a sua utilidade em estudos “disfarçados”. Tais testes incluem a medição das IgG 4, o teste de provocação-neutralização (os extractos são colocados sob a língua ou injectados para diagnosticar e tratar vários sintomas), o electrodérmico, o da citotoxicidade dos leucócitos e o de cinesiologia aplicada (teste de força muscular) [95].

Dietas de eliminação

A melhoria dos sintomas durante as dietas de eliminação dos alimentos suspeitos constitui um dado sugestivo de causalidade. Para as crianças, a eliminação apenas envolve uma alteração na fórmula, mas o procedimento é mais complicado nas crianças amamentadas (para quem a dieta materna deve ser restrita), nas crianças mais velhas e nos adultos [96]. Podem ser realizadas por remoção dos alimentos que se pensa causarem os sintomas, por remoção de todo o grupo definido de alimentos que são raramente alérgicos (dieta oligoantigénica), ou pelo fornecimento de uma dieta elementar de uma fórmula hipoalergénica, extensivamente hidrolisada ou de uma fórmula à base de aminoácidos não-alergénicos. A dieta elementar fornece a melhor triagem, embora possa ser difícil de realizar. O tipo de dieta seleccionada depende do cenário clínico, do raciocínio “*à priori*” sobre os alimentos ofensivos, derivado dos dados epidemiológicos e dos resultados dos testes de IgE. A duração do ensaio depende do tipo de sintomas, mas 1-6 semanas geralmente é o necessário. Estas dietas são difíceis de gerir e é necessário o aconselhamento especializado de alergistas e nutricionistas para garantir a adequação nutricional, uma prevenção precisa e a interpretação correcta dos resultados. Quando é removido um alimento ao qual o paciente é sensível, durante uma doença crónica, a sua reintrodução pode induzir reacções severas. Quando uma dieta de eliminação é bem sucedida, um efeito *placebo* potencial deve ser considerado e a relação entre a alimentação e os sintomas deve ser confirmada, quando indicado, através de desafios orais [58].

Oral food challenges (OFC)

Este teste é executado por um médico, alimentando-se gradualmente o paciente com quantidades crescentes dos alimentos sob suspeita, durante horas ou dias [96]. Os desafios orais são feitos de forma aberta, com conhecimento do paciente, ou mascarados por camuflagem do alimento em teste num outro alimento de transporte ou em cápsulas opacas. O desafio de duplo conhecimento, com efeito *placebo* controlado (DBPCFC) é o método menos sujeito a desvios. Este método pode testar qualquer tipo de alimento suspeito. O procedimento é o mais utilizado quando vários alimentos são considerados, quando os testes da IgE são positivos e quando a dieta de eliminação resulta no desaparecimento dos sintomas. A configuração do teste também permite testar alimentos altamente suspeitos, apesar dos testes de “*Prick*” e do RAST darem negativos. Para as reacções não mediadas por IgE, os desafios orais são normalmente o único meio de diagnóstico. Também são necessários para monitorizar os pacientes que se possam tornar tolerantes [58].

Estes testes, particularmente para as reacções de IgE, dermatites atópicas severas e síndromes de enterocolite, podem provocar reacções graves. Como regra geral, nunca devem ser feitos em casa [97]. O alergista que supervisiona deve ter medicamentos e suprimentos para uma reanimação imediata. Os desafios podem ser opcionais ou contraindicados, dependendo das circunstâncias e os riscos devem ser pesados tendo em conta os aspectos sociais e nutricionais da eliminação contínua. Casos de anafilaxia após uma ingestão isolada, tendo um teste positivo para a IgE específica para o alimento causal é um exemplo de uma contraindicação relativa, visto que representa uma história convincente. A taxa de falsos negativos de DBPCFC é de 3%, pelo que estes devem ser sempre seguidos por uma alimentação aberta supervisionada, com a inserção dos alimentos testados na sua forma mais consumida [98].

Finalmente, as provas específicas consistem na avaliação funcional e morfológica do tubo digestivo como um importante método de avaliação da sua integridade e funcionalidade [99].

A determinação dos epítomos dos anticorpos IgE para o alergénio pode auxiliar no diagnóstico, uma vez que cada tipo de epítopo ligado pode reflectir diferenças na ligação ao alergénio, transmitindo características desde uma alergia leve ou transitória a uma severa ou persistente. Estas análises não estão disponíveis de uma forma prática no mercado, apenas através das análises da biologia celular e molecular [6]. Nenhum dos testes mencionados, por si só, é decisivo para o diagnóstico final [100].

A confirmação correcta do diagnóstico, tanto em reacções mediadas como em não mediadas por IgE, necessita da eliminação total dos sintomas após a exclusão dos alimentos suspeitos [87]. Nesse sentido, o diagnóstico correcto é essencial não só para direccionar o

tratamento, como também para evitar a restrição alimentar desnecessária, que, se prolongada, poderá condicionar o estado nutricional do paciente [101].

Os desafios orais são portanto precisos e sensíveis mas podem colocar os doentes em risco de reacção. Também exigem bastantes recursos para serem conduzidos e monitorizados. Os testes de “*Prick*” e a identificação da IgE são mais seguros que o desafio oral, no entanto são pouco específicos e nem sempre se correlacionam com a reactividade clínica. A padronização dos procedimentos dos desafios e a sua interpretação devem ser promovidas. São necessárias novas abordagens para melhorar os diagnósticos de uma alergia clínica, sem a necessidade de um desafio alimentar [11].

Testes nas crianças de alto risco

As crianças com um pai/mãe ou irmão com alergia têm um risco acrescido. As evidências não suportam os testes de rotina nessas crianças, antes da introdução de alimentos altamente alérgicos na sua dieta como o leite, ovo ou o amendoim [9]. Há directrizes que recomendam a introdução de todos os alimentos de desmame (incluindo os alergénios comuns) por volta dos 4 a 6 meses, independentemente do historial familiar ou da coexistência de eczema.

No entanto, a avaliação pelos testes cutâneos ou por IgE pode ser considerada numa base individual se os alergénios ainda não foram introduzidos na dieta. Também podem ser considerados nas crianças que apresentaram eczema nos primeiros meses de vida. Se os resultados dos testes de triagem de IgE forem positivos, e com uma probabilidade >95% ou >95% de limites de especificidade, a alergia é bastante provável; no entanto, se os resultados forem positivos mas com uma probabilidade de ocorrência ou de especificidade <95%, um desafio será indicado para se esclarecerem as dúvidas [11].

Os factores que poderão afectar o estado nutricional da criança envolvem a ingestão alimentar insuficiente do ponto de vista qualitativo e quantitativo; mal absorção intestinal; perda de substâncias que aumentem a necessidade de nutrientes (por exemplo, perda de sangue oculto nas fezes ou de proteínas na enteropatia) e o eventual estado inflamatório que aumenta a necessidade energética da criança [8].

2.7. Tratamento

A terapia primária de uma AA implica evitar o consumo dos alimentos causais. Uma educação preventiva inclui uma especial atenção à leitura dos rótulos, cuidados na obtenção de alimentos de estabelecimentos de restauração e evitar o contacto cruzado dos alimentos

alérgicos durante a preparação da refeição, assim como evitar a partilha de placas de corte, máquinas de corte e de misturadoras [6].

Existem vários medicamentos que podem dar alívio a certos aspectos das desordens. Os anti-histamínicos podem aliviar parcialmente os sintomas da síndrome de alergia oral e os sintomas cutâneos mediados por IgE. As terapias anti-inflamatórias podem ser benéficas para a esofagite eosinofílica alérgica ou para a gastroenterite. Note-se que a chave para o tratamento da anafilaxia é a administração imediata de epinefrina [6]. Quando apenas são administrados anti-histamínicos para tratar as reacções agudas, os doentes devem ser monitorizados quanto a sintomas mais significativos. Se os sintomas se tornam mais graves, a epinefrina deve ser administrada imediatamente. Para os pacientes com um historial de reacções severas, a epinefrina pode ser administrada logo no aparecimento dos primeiros sinais [11].

Os anti-histamínicos são às vezes a única medicação necessária para reduzir o prurido e as erupções cutâneas. No entanto, para os pacientes com sintomas de anafilaxia mais graves, ou com sintomas respiratórios e/ou cardiovasculares, é necessário um tratamento adicional [102].

O tratamento destes pacientes inclui a ressuscitação cardiopulmonar, a administração de epinefrina, a par da utilização de anti-histamínicos, corticosteróides, oxigénio, fluidos intravenosos, broncodilatadores inalados, assim como medicação para suportar a pressão sanguínea [58]. A adrenalina é o principal fármaco de tratamento da anafilaxia [102]. A injeção intramuscular permite uma absorção mais eficiente do que a subcutânea [103]. A dose é de 0,01 mL kg⁻¹ para uma diluição de 1:1000 de epinefrina líquida por via intramuscular (dose máxima 0,3-0,5 mL, 0,3-0,5 mg). As doses pré-medidas para autoinjecção permitem a pronta administração pelos pacientes [58].

As indicações para a administração do fármaco geralmente incluem os sintomas alérgicos respiratórios ou cardiovasculares após uma exposição conhecida ou possível, mas os doentes com historial podem justificar o tratamento após uma ingestão casual do alimento indutor, mesmo quando não há sintomas. As indicações e técnica de administração da adrenalina autoinjectável devem ser revistas periodicamente, uma vez que os erros são comuns [104].

Os pacientes devem ser instruídos de que, depois de terem tomado o medicamento, devem procurar de imediato o transporte rápido a um serviço de emergência com uma observação prolongada (> 4 h), visto que os sintomas graves podem ser recorrentes [105].

Deve ser desenvolvido um plano conciso e escrito para o tratamento das reacções alérgicas resultantes da exposição accidental ao alimento indutor, sendo as cópias colocadas à disposição das pessoas adequadas (por exemplo, fornecedores, professores, empregados das indústrias e das escolas) [106].

Os indivíduos devem ser instruídos a ler os rótulos alimentares com cuidado, prestando atenção aos ingredientes escondidos como "aromatizante natural" ou "especiarias" que podem indicar a presença de alergénios, assim como a menção de "pode conter"[107].

Os pacientes deverão ser lembrados da actualização dos injectores de epinefrina expirados ou gastos. Ter um plano de emergência claro no local, medicamentos rapidamente disponíveis e pessoal escolar formado no reconhecimento e tratamento de reacções são factores muito importantes na gestão das AAs nas escolas [108].

As dietas de eliminação podem ser úteis nos jovens infantis em alguns casos de eczema, especialmente nos que apresentam evidências do consumo de alimentos indutores ou de doença persistente, apesar de estarem sujeitos a uma terapia atópica agressiva [109].

Logo que uma AA seja diagnosticada, a eliminação directa do alimento responsável é necessária. Uma dieta de eliminação, devidamente gerida e bem equilibrada pode levar à resolução dos sintomas, mantendo o estado nutricional. Quando a dieta é usada como tratamento, os alergénios identificados são retirados indefinidamente, a não ser que exista evidência de que a alergia foi superada [23,6].

Não está claro se a restrição da dieta materna durante a gravidez ou lactação afecta o desenvolvimento ou evolução clínica da alergia. Neste enquadramento não são recomendadas as restrições do consumo de potenciais alimentos alérgicos durante a gravidez ou lactação [9, 110].

As opções terapêuticas de futuro incluem estratégias que têm como alvo alimentos específicos e que bloqueiam as respostas alérgicas não específicas de certos alimentos. A tabela 2.12. (Anexo XI) resume algumas das actuais estratégias. De notar, as abordagens imunoterapêuticas sob estudo têm tentado evitar os efeitos adversos graves que seriam desencadeados pela injeção de alergénios nativos, tal como observado num estudo de injeção imunoterapêutica para o amendoim [111], mudando a via de administração ou modificando as proteínas de tratamento. A investigação mais recente é a imunoterapia oral (OIT), em que as doses de proteína são dadas em quantidades crescentes, gradualmente, até uma dose de manutenção [6]. Pensa-se que a OIT restaura ou induz um estado de tolerância. Contudo, tem que ser feita uma distinção entre a dessensibilização, na qual o alergénio é ingerido sem sintomas durante o tratamento, necessitando da ingestão diária, e a tolerância, em que o alimento pode ser ingerido sem sintomas, apesar de períodos de abstinência. Os estudos indicam que a OIT induz a dessensibilização, contudo não é claro se a tolerância é alcançada [112]. Note-se contudo que são necessários mais estudos para se avaliar a sua segurança, eficácia e os seus mecanismos [113].

As dietas que contêm leite e ovo cozidos podem representar uma abordagem alternativa à imunoterapia oral. A imunoterapia sublingual demonstrou resultados promissores na diminuição da sensibilização, com poucos efeitos secundários durante o tratamento. Os tratamentos com

antigénios modificados, administrados por via epicutânea, ou a fitoterapia chinesa, estão sendo testados para eventual futura utilização. Além disso, o tratamento com antibióticos anti-IgE ou prebióticos/probióticos, quer isoladamente ou em combinação com outras formas de imunoterapia, poderá aumentar as doses limite necessárias para estimular uma reacção e fornecer perfis de maior segurança para os pacientes [11].

Num estudo piloto recente, 11 crianças com alergia ao leite de vaca foram submetidas a uma dessensibilização bem sucedida e segura, utilizando uma imunoterapia oral em combinação com uma terapia anti-IgE [114]. Estão a ser efectuados e testados novos estudos para avaliar a eficácia a longo prazo e a segurança destas novas terapias, antes de serem utilizadas no cuidado regular das crianças ou dos adultos alérgicos [11].

A figura 2.4. apresenta um algoritmo simplificado do diagnóstico e gestão de uma alergia alimentar.

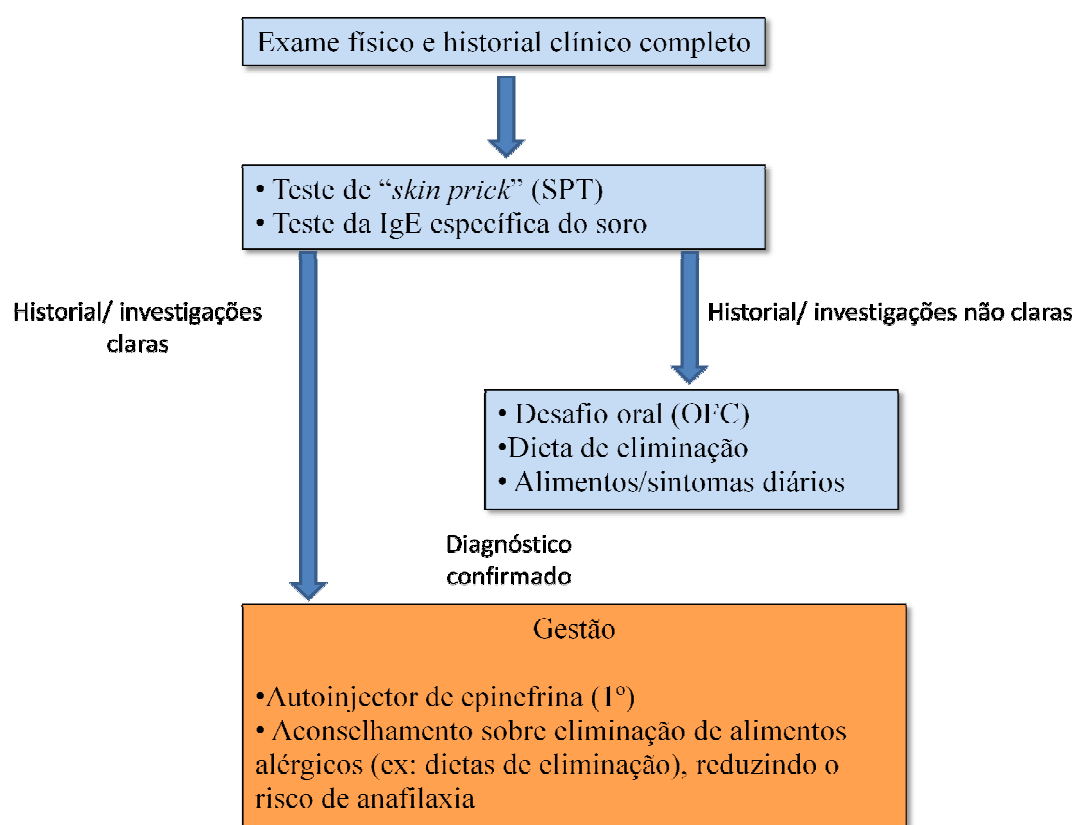


Figura 2.4. – Algoritmo simplificado para o diagnóstico e gestão de uma alergia alimentar (adaptado de: [106]).

2.8. Prevenção

A estratégia mais segura para prevenir ou gerir uma AA é a restrição, não só de todos os alimentos directamente responsáveis, como também daqueles que poderão conter o alergénio na sua composição. É assim essencial conhecer quais são os ingredientes que compõem uma receita ou preparação culinária, mesmo quando a presença do alimento alergénico em questão não é aparente. Por exemplo, a confecção do puré de batata poderá incluir como ingredientes o leite, ovo e farinha de trigo, que muitas vezes não são considerados e que devem ser evitados, se uma reacção alérgica lhes estiver associada. Para prevenir uma ingestão accidental, é fundamental a educação dos pacientes para a leitura e interpretação de rótulos alimentares, no sentido de identificar alergénios potencialmente escondidos. Os alimentos processados incluem-nos muitas vezes, que podem não ser evidentes pela sua designação, p.e., a presença de frutos secos num chocolate de leite. Por vezes a presença ocorre por contaminação cruzada nas linhas de produção dos alimentos processados, por exemplo quando se utiliza a mesma de linha para chocolate de leite e para chocolates com frutos de casca rija ou bolacha (trigo) [24].

Quantidades muito reduzidas do alergénio podem ser suficientes para provocar uma reacção grave. Muitas vezes um alimento aparentemente seguro pode desencadear uma reacção alérgica, apenas por ter entrado em contacto com outros alimentos que têm o alergénio. Este fenómeno designa-se de contaminação cruzada, podendo em alguns casos ter consequências severas. Existem pequenos cuidados e medidas simples na preparação e produção de alimentos e refeições, que podem prevenir a contaminação cruzada e que permitem garantir a ingestão de alimentos seguros:

- ✓ Lavar correctamente as mãos entre as várias etapas de manipulação de alimentos;
- ✓ Não usar os mesmos utensílios durante a preparação, confecção, empratamento e distribuição de refeições (talheres, misturadoras, batedeiras, tábuas de corte, pratos, travessas, tachos, panelas e outros);
- ✓ Não utilizar o mesmo óleo de fritura ou água de cozedura para diferentes alimentos;
- ✓ Não utilizar as mesmas bancadas ou superfícies de contacto para a manipulação de alimentos;
- ✓ Durante as refeições, os doentes com alergia alimentar devem evitar a partilha de utensílios (talheres, pratos, guardanapos, copos) ou o contacto directo com alimentos potencialmente alergénicos [24].

Nos Estados Unidos da América, União Européia, Austrália, Japão e Singapura, as leis de rotulagem alimentar exigem que os fabricantes declarem em linguagem clara na embalagem se um dos alergénios comuns (ovo, leite, trigo, soja, peixe, marisco/crustáceo, amendoim, nozes) ou um produto derivado é usado como um ingrediente. Estas leis não são aplicadas em muitos países a nível mundial e, neste contexto, é necessário muito cuidado para as formas ocultas serem identificadas, tais como a ovalbumina e ovocumóide como ingredientes do ovo ou a caseína do leite [11].

A intervenção do nutricionista tem um papel importante na aplicação das medidas de prevenção, podendo estas ser divididas em: prevenção primária, quando a intervenção é realizada na fase anterior ou durante a exposição aos alergénios (prevenção da sensibilização); prevenção secundária, entre a sensibilização e o desenvolvimento dos sintomas alérgicos; e prevenção terciária, que se refere ao tratamento das doenças alérgicas após a sua instalação [115].

A gestão dietética de uma AA nem sempre é fácil. As contaminações cruzadas e os erros cometidos nos estabelecimentos de embalamento e restauração são um obstáculo adicional. Para as crianças, a gestão da dieta nas escolas pode ser difícil, pois a partilha dos alimentos, os projectos escolares que usam alimentos, as festas, a falta de pessoal médico no local e outras questões poderão subsistir de forma recorrente [116].

Não existem estudos clínicos que tenham demonstrado que a eliminação dos alergénios alimentares diminui o estado nutricional. No entanto, alguns autores que avaliaram as medidas de crescimento *versus* os registos de dieta têm sugerido que estas alergias colocam as crianças em risco de nutrição inadequada [117, 118]. No caso das alergias pediátricas é aconselhável envolver um nutricionista na formulação de uma dieta nutricionalmente adequada e isenta do alergénio. Como regra geral, devem ser evitados somente os alimentos aos quais o paciente é alérgico [11].

Existem dados limitados sobre a prevenção primária através das dietas, apesar de vários estudos terem obtido resultados nas doenças atópicas, nomeadamente na dermatite atópica e na asma. As organizações profissionais, baseando-se nas literaturas disponíveis, têm concluído que não existem evidências suficientes na redução das doenças atópicas através da eliminação materna dos compostos alérgicos durante a gravidez ou lactação, embora subsistam outros dados que afirmam o contrário. Para as crianças com um historial familiar de atopia, sujeitando-as a um risco elevado, os dados apoiam a prática exclusiva da amamentação durante pelo menos 4 meses, em comparação com a alimentação através de fórmulas de leite de vaca inteiro, para diminuir a incidência acumulada das dermatites atópicas e da alergia ao leite na amamentação, nos primeiros dois anos. Da mesma forma, a eliminação de alimentos sólidos durante os primeiros 4 a 6 meses está associada à redução do risco das dermatites [6].

Uma outra recomendação seguida, se necessária, é o uso de fórmulas hipoalergénicas (sem soja) como suplementação [58].

Além disso, para os lactentes que não sejam exclusivamente alimentados com leite materno, o uso das fórmulas de proteína inteira (leite de vaca ou de soja), em comparação com o uso das fórmulas hidrolizadas parcialmente ou extensivamente nos primeiros meses, parece estar associado a um maior risco de dermatite atópica. Depois dos 4 a 6 meses, não existem dados suficientes que digam que a remoção dos alérgenos específicos reduz os sintomas da atopia [6].

Os alimentos ingeridos pela mãe podem passar na forma imunologicamente intacta através do leite materno [119] e induzir reacções na criança [120]. Vários trabalhos têm demonstrado que as crianças de famílias atópicas, cujas mães tenham excluído alimentos altamente alérgicos das suas dietas, geralmente sofrem menos dermatites e alergias do que aquelas cujas mães tenham seguido dietas não restritivas [121, 122]. Contudo, estas diferenças poderão não se estender para além da primeira infância, pelo que um efeito a longo prazo na prevenção é incerto [58].

Além disso, as restrições durante a gravidez geralmente parecem ser ineficazes [118]. Em última análise, não existem recomendações definitivas sobre a restrição durante a lactação, no que diz respeito à prevenção de alergias. As recomendações nos Estados Unidos da América [110], quando um ou ambos os pais e irmãos são atópicos incluem: eliminação do amendoim e nozes, tendo em consideração a eliminação de outros alimentos durante a amamentação; a eliminação do amendoim durante a gravidez; e a introdução tardia dos alimentos alérgicos (leite para 12 meses, ovo até 24 meses e o amendoim, nozes e peixe até 36 meses). Embora em alguns estudos se tenha diminuído a prevalência das alergias, dermatites atópicas e sensibilizações em 30-50% dos casos, nos primeiros 2 anos de vida, usando uma aproximação deste tipo, não houve uma diferença significativa nos parâmetros atópicos nas idades dos 4 aos 7 anos [121,123], pelo que o efeito de redução na progressão da doença ainda não está comprovado, sendo necessários mais estudos para a validar. Para complicar ainda mais, o leite materno das mães atópicas poderá conter citosinas que induzem respostas imunes nas crianças, levando às reacções alérgicas, pelo que os estudos “mascarados” serão necessários para se identificarem as melhores práticas nos grupos de pacientes definidos [58].

2.9. Alergénios e rotulagem/legislação

No dia 13 de dezembro de 2014 entrou em vigor o Regulamento (UE) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, que estabelece os novos requisitos para a rotulagem dos alimentos, garantindo que os consumidores receberão informação mais clara, completa e precisa sobre o conteúdo dos alimentos.

Esta normativa consolida e actualiza dois campos da legislação no que concerne à rotulagem: os rótulos gerais dos produtos alimentares, regulamentados pela directiva 2000/13/CEE, e a rotulagem nutricional, objectivo da diretiva 90/496/CEE (a informação nutricional obrigatória entra apenas em vigor a 13 de dezembro de 2016).

O objetivo do Regulamento é conseguir um alto nível de protecção da saúde dos consumidores e garantir o seu direito à informação, para que os consumidores tomem decisões com conhecimento de causa [124].

Esta norma introduziu quatro alterações principais ao nível da legibilidade dos rótulos, país de origem, alergénios e informação nutricional obrigatória.

No que diz respeito aos alergénios, nos alimentos embalados a informação sobre estes deverá aparecer na lista de ingredientes, devendo destacar-se mediante uma composição tipográfica que a diferencie claramente do resto da lista de ingredientes (por exemplo, mediante o tipo de letra, estilo ou cor de fundo). No caso de ausência de uma lista de ingredientes deve incluir-se a menção “contém”, seguida da substância ou produto que figura no anexo II do próprio regulamento [124].

É tomado especial cuidado durante o fabrico de alimentos processados de modo a evitar contaminações cruzadas de um produto alimentar com alergénios provenientes de outros alimentos através de boas práticas de fabrico e de higiene, incluídas na implementação dos sistemas HACCP, obrigatória em todas as instalações da cadeia de distribuição alimentar. No entanto, pode verificar-se a possibilidade de que um produto que, por exemplo, não inclui intencionalmente nozes na sua receita, mas que é produzido nas mesmas instalações que um produto que contém nozes, eventualmente pode conter vestígios de nozes, e por este motivo os respectivos alergénios. Na maioria dos casos, a probabilidade de tal contaminação cruzada é referida voluntariamente ao abrigo da referida captação "Pode conter", na embalagem, servindo desta forma como informação importante para os consumidores [65].

A informação também deverá ser indicada nos alimentos não embalados ou nos que se embalam no ponto de venda, como por exemplo nos estabelecimentos de restauração [125].

O Regulamento permite aos Estados-Membro, caso seja necessário, estabelecer normas nacionais que regulem as modalidades mediante as quais se fornece esta informação [124].

Nos termos da legislação os 14 alergénios considerados os principais responsáveis por causar alergias alimentares são:

1. Cereais que contêm glúten (trigo, centeio, cevada, aveia, espelta, gamut ou outras estirpes hibridizadas) e produtos à base destes cereais;
2. Crustáceos e produtos à base de crustáceos;
3. Ovos e produtos à base de ovos;
4. Peixes e produtos à base de peixe;
5. Amendoins e produtos à base de amendoins;
6. Soja e produtos à base de soja;
7. Leite e produtos à base de leite (incluindo lactose);
8. Frutos de casca rija, nomeadamente, amêndoas, avelãs, nozes, castanhas de caju, pistáchios, entre outros;
9. Aipo e produtos à base de aipo;
10. Mostarda e produtos à base de mostarda;
11. Sementes de sésamo e produtos à base de sementes de sésamo;
12. Dióxido de enxofre e sulfitos em concentrações superiores a 10 mg/Kg ou 10 mL L⁻¹;
13. Tremoço e produtos à base de tremoço;
14. Moluscos e produtos à base de moluscos [125].

A legislação interna do Governo Português que se aplica actualmente nesta matéria corresponde ao Decreto-Lei n.º 156/2008 e ao Decreto-Lei n.º 54/2010, que introduz algumas alterações ao primeiro.

3. Proteínas de Origem Animal e Vegetal

Embora a diversidade da dieta humana seja enorme, apenas um pequeno número de alimentos são responsáveis pela maioria das AAs em todo o mundo. Leite, ovos e amendoim são os produtos alimentares responsáveis pela grande maioria das reacções alérgicas induzidas por alimentos em crianças, ao passo que o amendoim, nozes, peixe e marisco causam a maioria das reacções alérgicas induzidas por alimentos em adultos [33].

Segunda Rona et al. [126], as AAs são classificadas pela OMS como o sexto problema de saúde humana, representando um aumento do risco de saúde para a população dos países industrializados, com cerca de 5-6% das crianças e até 2% dos adultos sofrendo de algum tipo de AA mediada pela imunoglobulina E (IgE). A incidência de AAs tem vindo a aumentar em todo o mundo, sobretudo nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 125 - 150 pessoas morram em cada ano como resultado da anafilaxia alimentar [127]. Na última década, foram identificadas muitas centenas de alergénios numa variedade de produtos alimentares derivados de animais e de plantas, tendo como resultado a criação de uma série de bancos de dados destinados a recolher as informações existentes sobre alergénios, as suas propriedades físico-químicas e a sua relevância alérgica [33].

3.1. Proteínas animais

Os alimentos de origem animal mais comuns e que possuem proteínas alérgicas são os ovos, o leite de vaca, o marisco, os moluscos e o peixe. No caso do leite, o primeiro alimento para os recém-nascidos, trata-se basicamente da alergia ao leite de vaca (ALV), sendo definida como uma reacção imunológica contra as proteínas do leite de vaca. Esta é a terceira alergia alimentar mais frequente em França, durante a infância, correspondendo a cerca de 9% do total das alergias diagnosticadas [128]. As proteínas mais abundantes são a α S1-, α S2-, β - e κ -caseínas, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (β -LG) sendo estes os principais alergénios no leite [129]. No entanto, existem outras proteínas presentes no leite em quantidades inferiores, tais como a albumina do soro bovino, lactoferrina e IgG de cadeia pesada, que também são reconhecidas como alergénios causadores de APLV [33].

De acordo com Anet et al. [130], os ovos de galinha são uma das causas mais frequentes de reacções adversas aos alimentos de origem animal. Alguns estudos [94] demonstraram que estas são causadas sobretudo pela clara do ovo, com uma proporção de cerca de 2/3 das crianças

diagnosticadas com AAs a reagirem a este alimento. Sampson e Ho [94] estimam que a alergia ao ovo afecte cerca de 1,6 - 3,2% das crianças, o que faz dela a segunda causa mais comum das AAs na infância. Os principais alergénios presentes nos ovos são proteínas e estão sobretudo presentes na clara de ovo (ovalbumina, ovomucóide, ovotransferrina e lisozima). Não obstante, a gema de ovo também apresenta um baixo nível de alergenicidade (*R-livetina*) [33]. Por outro lado, a presença de tropomiosina é responsável pelo potencial alérgico do marisco. Trata-se de uma proteína termoestável essencial para a contracção dos músculos em vertebrados e invertebrados [131]. Os alergénios dos moluscos e das ostras (*Cra g 1*, *Cra g 2*), do abalone (*Hal m 1*), caracol (*Tur c 1*) e lula (*Tod p 1*), foram identificados como sendo tropomiosinas [132]. Digestões retardadas podem colocar os doentes com alergia ao peixe em risco de desenvolver reacções alérgicas graves, mesmo até a pequenas quantidades dos compostos, dado que o peixe é um dos alimentos que causam reacções mais severas. No entanto, demonstrou-se [133] que a digestão gástrica reduz significativamente a sua capacidade alérgica. Apesar disso, autores como Untersmayr et al. [133] alertam para o facto de que a digestão incompleta do bacalhau representa um factor de risco de anafilaxia em pacientes alérgicos.

3.1.1. Tropomiosinas

Nos invertebrados, as tropomiosinas são proteínas com 34-41 kDa que possuem uma acentuada homologia nas suas sequências de aminoácidos [134] e são responsáveis pela maioria das alergias ao marisco, mediadas por IgE [135]. Atente-se contudo que as tropomiosinas dos vertebrados não são alérgicas, já tendo sido identificadas pelo menos dez diferentes em crustáceos e seis em moluscos. Recentemente também foram identificadas três novas classes em camarão, para além das tropomiosinas, incluindo a quinase da arginina (*Pen m 2* e *Lit v 2*), uma proteína ligante de cálcio sarcoplasmático (*SCP* e *Lit v 4*) e miosina de cadeia leve (*Lit v 3*) [136].

3.1.2. Caseínas

As caseínas são proteínas presentes no leite dos mamíferos que se ligam ao cálcio através de um aglomerado de fosfoserina e resíduos de fosfotreonina da α 1-caseína, α 2-caseína e β -caseína. Estes tipos de caseínas formam agregados em torno do fosfato de cálcio amorfo [137], aumentando o nível de cálcio no leite. A κ -caseína estabiliza essas nanoestruturas. A α 1-caseína e a α 2-caseína parecem ser os alergénios mais importantes, seguindo a β -caseína. As

caseínas exibem uma estrutura em serpentina aleatória. Foi demonstrada a reactividade cruzada por IgE entre as caseínas do leite de vaca e as caseínas do leite da cabra e da ovelha, [138], enquanto as caseínas do leite de égua parecem representar um risco menor de reactividade cruzada.

3.1.3. Outras famílias de alergénios alimentares de origem animal

Existem vários alergénios que pertencem a famílias menos conhecidas, como a β -lactoglobulina (*Bos d 5*) do leite, pertencente à família das proteínas lipocalinas. Os membros desta família possuem uma estrutura tridimensional com uma semelhança da sequência total baixa, mas que serve de base para a síntese de uma variedade de pequenas moléculas tais como lípidos, esteróides, hormonas e retinóides [139].

Outras famílias incluem os inibidores da protease do tipo “*Kazal*”, que são representados pela proteína ovomucóide da clara do ovo da galinha, a *Gal d 1* [140]. Foram ainda referenciadas como alergénios proteínas da família dos inibidores das proteases com serina ou serpina (*SPI*). Exemplo disso é a ovalbumina *Gal d 2* [141]. Alguns alergénios dos peixes ósseos e dos anfíbios são proteínas do domínio *EF* (*helix-loop-helix structural domain*). Por último, foram também identificadas transferrinas (glicoproteínas com ligações de ferro ricas em enxofre) como alergénios menores no leite (lactoferrina) e no ovo (ovotransferrina, *Gal d 3*) [142].

3.2. Proteínas vegetais

Segundo Rona et al. [126], apenas três famílias dominantes de proteínas alérgicas vegetais foram identificadas, as prolaminas, as cupinas e a família das *Bet v 1*. Os alimentos vegetais mais comuns que possuem proteínas alérgicas incluem o amendoim e a soja, tal como é indicado na tabela 3.1. O amendoim e o feijão de soja têm sido apontados como sendo altamente alérgicos e são responsáveis por reacções clínicas mediadas pela IgE em humanos [33].

Tabela 3.1. – Principais proteínas alergénicas vegetais (adaptado de: [33]).

Nr. Amostra	Planta (nome botânico)	Principais alergénios
1	Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	<i>Ara h 1</i> (63.5 kDa), <i>Ara h 2</i> (17–19 kDa) e <i>Ara h 3</i> (64 kDa)
2	Soja (<i>Glycine max</i>)	<i>Gly m Bd</i> (30 kDa), <i>Gly m Bd</i> (28 kDa) e <i>Gly m Bd</i> (60 kDa)
3	Lentilha (<i>Lens esculenta</i>)	Alergénios de PM: 72, 70, 68, 54, 52, 40, 38, 30, 21, 18 e 16–12 kDa
4	Grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i>)	Alergénios de PM <20, 70, 64, 62, 53, 51, 36–35, 28–26 e 22–20 kDa
5	Feijão verde (<i>Phaseolus</i> spp.)	Proteínas de PM: 71, 47 e 41 kDa
6	Feijão vermelho (<i>Phaseolus</i> spp.)	170, 100, 43, 34 e 20 kDa (subunidade básica das leguminas)
7	Tremoço (<i>Lupinus albus</i>)	Proteínas de PM: 78, 68, 65, 52, 45, 32, 18, 16.5 e 14 kDa
8	Melão (<i>Cucumis melo</i>)	Uma proteína de PM: 13 kDa
9	Cereja (<i>Prunus avium</i>)	<i>Pru av 3</i> (nsLTP), <i>Pru av 1</i> (homóloga da Bet v 1) e <i>Pru av 4</i> (profilina)
10	Maçã (<i>Malus domestica</i>)	<i>Natural Mal d 1</i> (nMal d 1)

Nota: Principais proteínas alérgicas vegetais. PM = Peso molecular da proteína. *Ara h* = *Arachis hypogaea*; *Gly m* = *Glycine max*; *Caj c* = *Cajanus cajan*; *Vig r* = *Vigna radiata*; *Pru av* = *Prunus avium*; *Mal d* = *Malus domestica*.

3.2.1. Prolaminas

Esta família é composta pelos três grandes grupos de alergénios alimentares vegetais: albuminas 2S, proteínas de transferência de lipídios não-específicas (*nsLTPs*) e os inibidores da α -amilase/tripsina dos cereais. Têm baixo peso molecular, são ricas em cisteína, tem dobras tridimensionais semelhantes que são ricas em α -hélices e são estáveis ao processamento térmico e à proteólise [33]. Também inclui outras prolaminas dos cereais.

3.2.2. Albuminas 2S

As albuminas 2S são um grande grupo de proteínas de armazenamento presentes em muitas plantas integradas nas monocotiledóneas e dicotiledóneas. Segundo Moreno e Alfonso [143], as albuminas 2S também podem desempenhar nas plantas uma função protectora contra ataques de fungos. Nos últimos anos, alguns membros desta família têm sido descritos como sendo alergénios alimentares que demonstram a sua capacidade de se ligarem à IgE do soro de

pacientes alérgicos. Como exemplos temos as albuminas da *Arabidopsis*, do rabanete, colza, feijão “caster”, das nozes e castanha do Brasil, do girassol, algodão em caroço e as da soja, *albumin 1* (*soy alb1*) e *albumin 3* (*soy alb3*).

3.2.3. Proteínas de transferência de lipídios não específicas (*nsLTPs*)

As *nsLTPs* desempenham um papel importante na defesa das plantas contra fungos e bactérias. Estas proteínas foram identificadas como sendo os principais alergénios de frutas em pacientes da região Mediterrânea. A estrutura típica das *LTPs* não-específicas baseia-se em quatro pontes de dissulfureto, as quais contribuem para a estabilidade global destas proteínas contra a digestão enzimática ou desnaturação térmica, embora a estabilidade esteja dependente do pH. Sob condições ácidas, a desnaturação térmica do alergénio do pêssego *Pru p 3* é reversível, ao passo que sob condições neutras o *Pru p 3* é incapaz de “redobrar” após o arrefecimento [144]. A sensibilização às *nsLTPs* é acompanhada por reacções graves, possivelmente por causa das propriedades biofísicas e bioquímicas específicas desta família. Pensa-se que a alta estabilidade das *nsLTPs* à digestão proteolítica seja a razão porque ocorrem reacções mais graves e sistémicas, comparadas com as de outros alergénios que são digeríveis no fluido gastrointestinal [145]. Aparecem com frequência nas frutas, nozes, sementes, cereais e vegetais. Exemplos disso são a *LTP* do trigo, a *LTPI* do arroz e a *LTP* do milho [33].

3.2.4. Inibidores da α -amilase e da tripsina

Os inibidores da α -amilase e das proteases dos cereais conferem alguma resistência às pragas de insectos que se alimentam dos tecidos vegetais. Estas proteínas são capazes de provocar reacções de sensibilidade por ingestão ou inalação. São encontradas nos cereais e afectam os indivíduos através dos pulmões, provocando alergias como a asma ao pó (trigo, cevada e centeio), ou pela via do trato gastrointestinal [33].

3.2.5. Prolaminas dos cereais

Estas prolaminas designadas de gluteninas e gliadinas no trigo, secalinas no centeio e hordeínas na cevada, são as principais proteínas do endosperma dos grãos dos cereais. São compostas por um terminal de N que contém cadeias de prolina e glutamina e por uma

extremidade de C não repetitiva, com resíduos de cisteína que formam as ligações dissulfito dentro da cadeia [146].

Estas extremidades têm sido indicadas como ricas em α -hélices [147].

As prolaminas que demonstraram maior reactividade com a IgE foram a glutenina de baixo peso molecular, a α e a γ gliadina [148]. A gliadina ω -5 (Tri a 19) é considerada importante, visto que provoca reacções alérgicas imediatas nas crianças quando ingerem produtos à base de trigo [149].

A estrutura secundária das prolaminas é apresentada na figura 3.1.

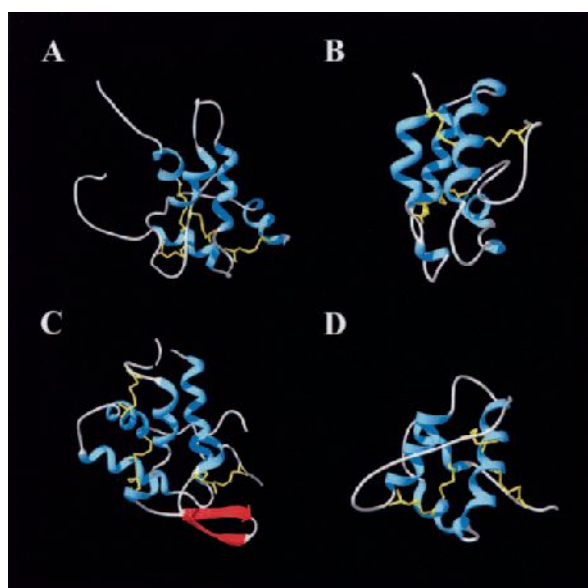


Figura 3.1. – Estruturas secundárias dos alergénios da família das prolaminas. A: albumina 2S da colza); B: *nsLTP* da cevada; C: inibidor da α -amilase do trigo; D: proteína hidrófoba das sementes da soja. Azul: α -hélices; vermelho: cadeias em β ; amarelo: ligações dissulfureto (fonte: [150]).

3.2.6. Família das “Cupins”

As cupinas são uma família de proteínas que partilham duas cadeias curtas e um domínio do núcleo estrutural em beta-barril (em latim *cupa* significa pequeno barril), motivo pelo qual lhes foi dado este nome. A família *cupin* compreende as principais proteínas de reserva das globulinas, principalmente as dos legumes e nozes. As globulinas estão divididas nas 7S vicilinas e nas 11S leguminas. As globulinas são alergénios altamente relevantes no amendoim, soja, lentilhas, nozes, avelã e no sésamo [150]. Apesar de ter níveis muito baixos de identidade de sequência, os seus membros têm estruturas conservadas. Em contraste com os alergénios da família *Bet v 1*, há pouca evidência de reactividade cruzada na IgE entre estes compostos, com

uma identidade de sequência global inferior a 40%. Note-se contudo que, segundo Wensing et al. [151], isso resulta numa reactividade cruzada muito limitada entre as “*cupins*” ou mesmo espécies estreitamente relacionadas, tais como o amendoim e a ervilha.

A estrutura proteica das cupinas é apresentada na figura 3.2.

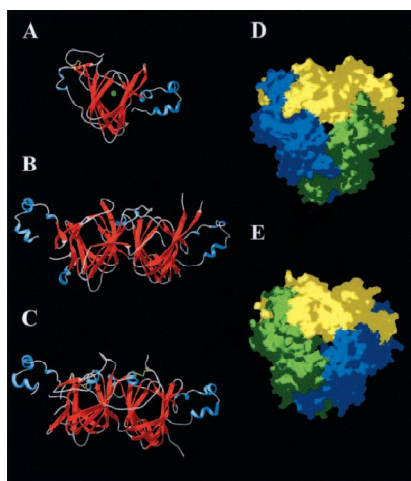


Figura 3.2. - Estruturas das proteínas da família das cupinas. A: monómero de germinação da cevada, uma proteína que contém um domínio de *cupin*. B: subunidade única da β -conglícinina da soja, uma vicilina; C: subunidade única da proglicínina da soja, uma legumina; D e E: superfícies moleculares dos trímeros da β -conglícinina e da proglicínina. Azul: α -hélices; vermelho: cadeias em β ; amarelo: ligações dissulfureto; verde: iões de manganês (fonte: [150]).

3.2.7. Família das *Bet v 1*

Os indivíduos com alergia ao pólen sofrem frequentemente de sintomas alérgicos após a ingestão de determinados alimentos de origem vegetal. A maioria destas reacções é causada por alergénios das frutas da família *Rosaceae* (por exemplo, maçã, cereja, damasco ou pêra) e vegetais da família *Apiaceae* (por exemplo, aipo, cenoura), que reagem de forma cruzada com alergénios que se encontram presentes no pólen das bétulas, particularmente com o principal alergénio, o *Bet v 1* [150]. Este foi o primeiro de muitos alergénios publicados que mostraram homologia com a subfamília *PR-10* das proteínas relacionadas à patogénese. Os alergénios *Bet v 1* são bastante instáveis ao aquecimento e digestão. Consequentemente, os sintomas estão restritos principalmente à cavidade oral. Em geral, o *Bet v 1* age como o primeiro agente de sensibilização [152]. Segundo Jenkins et al. [153], os elevados níveis de resíduos de superfície, conservados entre os membros da sua família, desempenham um papel importante na conservação dos epítomos de ligação à IgE e estão na base das síndromes de reacção cruzada dos pólenes da fruta e dos vegetais.

3.2.8. Outras famílias de alergénios alimentares vegetais

Novas famílias de proteínas estruturais, de armazenamento e de enzimas têm vindo a ser adicionadas. Para além dos tipos acima mencionados, existem outros alergénios pertencentes a famílias menos comuns.

3.2.8.1. Profilinas

As profilinas estão presentes em todas as células eucarióticas. São proteínas pequenas (12-15 kDa), estão localizadas no citosol e actuam como proteínas de ligação à actina. Elas podem desempenhar um papel-chave na regulação dos processos de transporte intracelular e na morfogénese e divisão celular [154]. Pensa-se que 10-20% dos pacientes alérgicos ao pólen das árvores apresentam sintomas alérgicos para a profilina [33].

3.2.8.2. Oleosinas

Estas proteínas contribuem para a estabilização dos corpos de armazenamento dos lípidos vegetais e representam a componente proteica (16 – 24 kD). Recentemente foram identificadas oleosinas com actividade alérgica a partir de legumes, nozes, amendoins e sementes [155].

3.2.8.3. Proteínas relacionadas com a patogénese

Estas proteínas (*PRs*) são reguladas a nível metabólico pelas plantas, para fazer face a ataques patogénicos ou à exposição a factores de stress abiótico. Foi identificado um considerável número de alergénios alimentares a partir de várias famílias de proteínas relacionadas com a patogénese, tais como a β -1,3-glucanase, vários tipos de quitinases e proteínas como a taumatina [156]. As quitinases vegetais são capazes de hidrolisar a quitina das paredes das células fúngicas e do exoesqueleto de hexápodes, podendo, portanto, desempenhar um papel na protecção da planta contra o ataque de pragas e agentes patogénicos. Podem ser encontradas, nomeadamente, nas cerejas, maçã, Kiwi, laranja, uvas e pimentão [33].

A tabela 3.2. apresenta alguns exemplos das *PRs*.

Tabela 3.2. – Alergénios do sistema defensivo das plantas (adaptado de: [150]).

Família proteica	Exemplos
PRs	
PR-2: endo- β 1, glucanases-3	Glucanase da banana
PR-3: Classe I das Citinases	<i>Pers a 1</i> (abacate), <i>Cas s 5</i> (castanha)
PR-4: Proteínas do tipo “Win”	<i>Bra r 2</i> (nabo)
PR-5: LTPs	<i>Pru av 2</i> (cereja), <i>Mal d 2</i> (maçã)
PR-9: Peroxidases	<i>Tri a Bd 36K</i> (trigo)
PR-10: Proteínas PR, intracelulares	<i>Api g 1</i> (aipo), <i>Mal d 1</i> (maçã)
Proteases	
Proteases de cisteína, do tipo da Papaina	<i>Act c 1</i> (kiwi), <i>Gly m Bd 30K</i> (soja)
Proteases de serina, do tipo da subtilisina	<i>Cuc m 1</i> (melão)
Inibidores de proteases	
Inibidores do tipo “Kunitz”	Inibidor da tripsina da soja

3.2.8.4. Glicoproteínas

As glicoproteínas também foram mencionadas como alergénicas. Alguns destes péptidos (23kDa) demonstraram ser glicoproteínas com uma porção de glicano ligada a um N, unindo-se aos anticorpos IgE no soro de pacientes sensíveis à soja. A ligação dos péptidos à IgE foi sugerida como sendo predominantemente dependente da sua porção de glicano [157].

3.2.8.5. Taumatina

Nas plantas, ela é sintetizada sobre *stress* biótico e abiótico e em certos estágios de desenvolvimento, particularmente durante o amadurecimento dos frutos. Tem uma massa molecular de cerca de 20 kDa, forma cadeias β -antiparalelas e é estabilizada através de oito ligações dissulfureto. Devido à sua estrutura rígida formada por estas ligações, é resistente ao tratamento térmico e à degradação fotolítica [158].

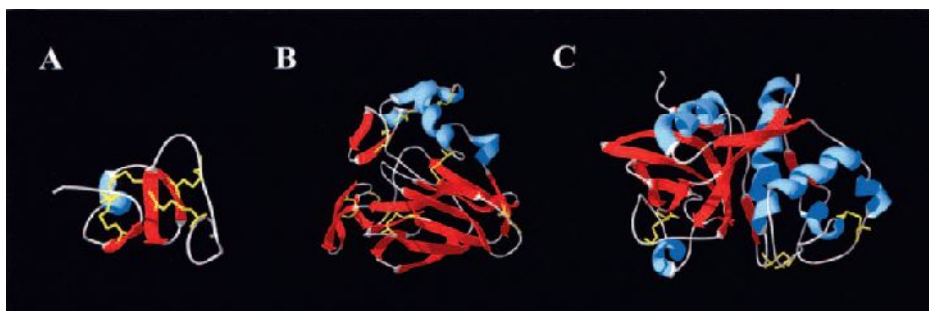


Figura 3.3. - Estabilização das estruturas alérgicas através das ligações dissulfureto. A: *Hevein* (Hev b 6,02), o principal alergénio do látex da *Hevea* brasileira; B: *Zeamatina* do milho, um membro da subfamília das *PR-5* (*TLP*); C: O maior alergénio dos kiwis, a *actinidina* (*Act c 1*), que é uma protease de cisteína do tipo da papaína. Azul: α -hélices; vermelho: cadeias em β ; amarelo: ligações dissulfureto (fonte: [150]).

3.2.8.6. Inibidores de proteases do tipo *Kunitz*

A família *Kunitz* dos inibidores da tripsina da soja é uma das muitas de inibidores de proteinases [160]. Engloba proteínas vegetais com actividade inibidora de várias proteinases, como por exemplo as proteinases de serina das famílias da tripsina e subtilisina, as de tiol e as de ácido aspártico. Todos os membros com esta capacidade inibidora contêm duas ligações por pontes de dissulfeto. Esta família está presente numa vasta gama de espécies de legumes e tem sido mais caracterizada na soja. Este inibidor *Kunitz* tem sido referido como de menor alergenicidade [161]. No entanto, também foi mencionado como indutor de anafilaxia [162]. A lecitina da soja, muito usada com emulsionante nos alimentos processados e nos cosméticos, contém uma pequena quantidade de proteínas reactivas à IgE, sendo estas inibidoras das proteases da soja [163]. As proteínas da batata que se ligam à IgE (PM= 16-20 Kd) foram identificadas como inibidores pertencentes a esta família dos *Kunitz* (*Sola t 2,3 e 4*) [164].

3.2.8.7. Outras proteases

As proteases estão agrupadas em famílias com base na sequência de similaridade. Duas dessas contêm propriedades alérgicas, as proteases de cisteína do tipo da papaína e as proteases de serina, do tipo da subtilisina. A família das papaínas inclui enzimas que podem ser encontradas nas eubactérias e eucariotes [164]. As suas estruturas, que são estabilizadas por três ligações por pontes de dissulfureto, são compostas por dois domínios, um α -helical e o outro contendo um β -barril, tal como é ilustrado na figura 3.3., ponto (C) [165].

Noutros frutos encontram-se proteases similares à papaína, onde se inclui a bromelaína do ananás, actinidina do kiwi e a ficina do figo. A actinidina (*Act c 1*) é o maior alergénio do kiwi, correspondendo a 50% da proteína total solúvel, e a ligações por IgE em 90% dos pacientes com alergia ao kiwi [166].

O único membro da família das subtilisinas descrito até agora é a cucumisina (*Cuc m 1*) do melão, que se liga à IgE para mais de 50% dos pacientes com alergia ao melão [167].

A tabela 3.3. apresenta alguns exemplos de outras proteínas alérgicas.

Tabela 3.3. – Outras proteínas alérgicas estruturais e metabólicas (adaptado de: [150]).

Família proteica	Exemplos
Proteínas de estrutura	
Profilinas	<i>Api g 4</i> (aipo), <i>Pru av 4</i> (cereja)
Oleosinas	Oleosina do amendoim
Proteínas de armazenamento	
Patatina	<i>Sola t 1</i> (batata)
Enzimas	
Redutases de éter benzílico fenilcoumaran	<i>Pyr c 5</i> (pêra)
Ciclofilinas	Ciclofilina da cenoura
β -Fructofuranosidases	<i>Lyc e 2</i> (tomate)
Oxidases dependentes do dinucleótido adenina-flavina	<i>Api g 5</i> (aipo)

4. Critérios de Identificação de Alimentos Alérgicos

As AAs tornaram-se uma séria preocupação para a saúde pública, devido à sua prevalência e elevada gravidade, assim como o potencial impacto que têm, não só na qualidade de vida dos afectados, como também na economia. Assim a perspectiva da Saúde Pública centrou-se na gestão de riscos a nível da sociedade, em detrimento de precauções a nível individual [168].

Com o considerável crescimento do número de alimentos para os quais as reacções alérgicas têm sido bem documentadas, houve a necessidade de rever os critérios, para resolver os problemas do ponto de vista da gestão de risco [168]. Os critérios apresentados de seguida constituem o resultado do trabalho do grupo de investigadores nomeado pela “*Food Allergy Task Force of the International Life Sciences Institute (ILSI) for Europe*” e incluem aspectos clínicos (diagnóstico, potência do alérgénio, gravidade das reacções), elementos da população (prevalência, tempo de exposição) e factores de modulação (processamento de alimentos) [168].

Segundo Bousquet et al. [169], mais de 160 alimentos já foram identificados como capazes de provocar reacções alérgicas, alguns em casos extremamente raros. Sendo impraticável gerir o risco de todos esses alimentos segundo a mesma base, tornou-se fundamental estabelecer prioridades, pelo que nesse contexto a avaliação de risco poderá fornecer uma base amplamente aceite para esse estabelecimento de prioridades.

O processo de avaliação de risco é convencionalmente dividido em quatro fases distintas: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco. Barlow et al. [170] refere que a caracterização dos riscos reúne dados da avaliação da exposição e caracterização do perigo. Existem várias diferenças entre a avaliação de risco toxicológico convencional e a avaliação de risco para alérgénios alimentares em relação ao desencadeamento de reacções. Apenas alguns indivíduos pertencentes ao sub-grupo populacional de consumidores sensíveis poderá ser afectado e mesmo dentro desse grupo, existem variações individuais de várias ordens de magnitude, por exemplo na dose de alérgénio necessária para desencadear a reacção, no estilo de vida, predisposição genética, medicamentos, factores da dieta e o grau de sensibilidade [171, 172].

Assim apresentam-se a seguir os critérios para permitirem identificar os alérgénios alimentares importantes para a saúde pública.

4.1. Aspectos gerais

Em 1995 foram identificados oito grupos de alimentos como as causas mais comuns de alergias alimentares mediadas pela IgE, em todo o mundo [173]. O principal critério de inclusão foi a frequência das reacções relatadas, embora estivesse implícita. Em 1998, a *ILSI Europe* reviu a lista e avaliou a qualidade das evidências de alergenidade [169]. Foram propostos dois critérios fundamentais, ou seja, alergenidade e a severidade das reacções.

A figura 4.1. apresenta o quadro proposto e os critérios que devem ser considerados para decidir se um alergénio alimentar tem importância suficiente para a saúde pública, determinando medidas obrigatórias de gestão de risco. Alguns dos critérios descritos correlacionam-se entre si, embora a ligação seja muitas vezes mal apreendida. Por exemplo, não existe nenhuma relação individual clara entre os níveis de IgE específicos para o alergénio, o grau de exposição ao alergénio e a reacção clínica adversa [174], embora para um número limitado de alergénios, os níveis de IgE possam prever o resultado do teste de DBPCFC [175]. No entanto, a quantidade e a qualidade dos dados que estão disponíveis para a maioria dos diferentes critérios, para a gestão de risco é largamente variável.



Figura 4.1. - Esquema de critérios utilizados para identificar os alimentos alérgicos de importância para a saúde pública (adaptado de: [168]).

4.2. Verificação do diagnóstico e severidade

Os dois primeiros critérios propostos destinam-se a confirmar se um alimento pode provocar uma reacção mediada por IgE e a severidade da reacção. Os diferentes tipos de dados clínicos disponíveis e o peso que lhes deve ser dado, com base na sua qualidade, estão descritos na tabela 4.1. Estes são avaliados através de um sistema de pontuação adaptado dos critérios utilizados na medicina baseada em evidências. A primeira indicação de que um determinado alimento é alérgico geralmente aparece como relato de casos isolados. Estes relatórios devem, idealmente, incluir um DBPCFC, realizado de acordo com um protocolo reconhecido, por exemplo, como o sugerido pelo EAACI em 1995 [176], dado que este é um pré-requisito para confirmar uma relação causal entre uma reacção clínica e a ingestão de um alimento suspeito. Seriam então necessárias outras evidências serológicas para confirmar que as reacções adversas observadas eram mediadas por IgE.

Tabela 4.1. -Tipo e nível (peso) das evidências dos dados clínicos nas alergias alimentares mediadas pela IgE (adaptado de: [168]).

Dados de suporte	Tipo de evidências	Nível de evidência
Mecanismo mediado por IgE	Pelo menos dois estudos em que as amostras dos pacientes e as proteínas alimentares estão bem definidos, demonstrando a presença de IgE ligadas.	1
	Estudos serológicos mostrando IgEs específicas ligadas aos alimentos/extractos.	2
	Estudos de um número reduzido de amostras de soro de pacientes que não estão devidamente caracterizados.	3
Reacções adversas provocadas por reacções mediadas por IgE	Estudos sistemáticos de DBPCFC (a, b) em pacientes bem caracterizados, com doses definidas do alimento específico e com as IgEs específicas de ligação.	1
	Série de pacientes com reacções bem documentadas aos alimentos suspeitos, confirmadas por DBPCFC (a) e com anticorpos IgE.	2a
	Igual ao anterior, mas não confirmadas por DBPCFC (a, b).	2b
	Casos reportados de sintomas clínicos e a presença de IgEs específicas de ligação ao alimento, mas não confirmadas por DBPCFC.	3
	Dieta de eliminação resolvendo os sintomas.	4

Ambos os critérios abaixo devem ser satisfeitos, isto é, deverá existir um alimento que possa causar a formação de anticorpos IgE e uma reacção adversa deverá ser mediada por IgE; a) Desafio oral DBPCFC; b) Desafios abertos para as crianças.

Os sintomas clínicos observados podem proporcionar informação em relação à gravidade da reacção. Mesmo na ausência de um DBPCFC, pode ser possível extrair alguma evidência sobre a potência do alergénio, se as informações sobre a quantidade que provocou a reacção

estiveram disponíveis [177]. Devem ser excluídas outras causas potenciais da reacção como, por exemplo, a reactividade com outro ingrediente alimentar ou com um vestígio de um alergénio não marcado [178,179].

A noção de que um dado alimento tem, provavelmente, um alergénio de importância para a saúde pública é reforçada por vários relatos de centros clínicos independentes. Através da avaliação dos dados clínicos de diferentes regiões geográficas será possível verificar a frequência relativa de reacções aos diferentes alergénios, proporcionando assim uma taxa aproximada da prevalência [168].

4.3. Alergenicidade

A maioria dos alimentos são produtos complexos, no entanto apenas algumas proteínas possuem uma alergenidade potencial relevante. Além disso, apenas pequenas porções das proteínas são reactivas, compreendendo alguns aminoácidos. Por exemplo, os indivíduos que são alérgicos ao leite, podem reagir a diferentes proteínas, ou a diferentes epítomos na mesma proteína. Como consequência, há grandes variações individuais no padrão de resposta alérgica, inclusivé para o mesmo alimento. O problema torna-se complicado pela variabilidade do próprio alimento. Note-se, por exemplo, que diferentes cultivares de maçãs ou espécies de peixe podem conter quantidades diferentes de proteínas alergénicas [180, 181]. Factores ambientais, tais como as condições de crescimento, maturação e condições de armazenamento, poderão modificar a alergenidade. A designação “potência alergénica” pode ser entendida como a quantidade de um alimento alérgico necessária para sensibilizar um indivíduo, ou como a quantidade de alimento necessária para provocar uma reacção num indivíduo já sensibilizado [168].

Esta potência pode ser descrita como a “frequência da dose-resposta” definida para a distribuição populacional das doses testadas que provocam a reacção, ou como a “severidade da dose-resposta”, correspondendo ao gradiente de severidade das reacções provocadas. Ambas as definições são importantes para a saúde pública. Será difícil, contudo, comparar alimentos que causam reacções de severidade média mas que são muito frequentes na população, com outros que causam reacções muito graves em poucos indivíduos [168].

As doses reactivas mínimas (*MED*) para vários alergénios podem ser determinadas em estudos clínicos através de estudos de desafio em série, começando com doses muito baixas, tal como é indicado na tabela 4.2.

Tabela 4.2. -Tipo e nível (peso) de evidências na potência alérgica, severidade e prevalência das reacções (adaptado de: [168]).

	Tipo de evidências	Nível de evidência
Potência	Estudos dos limiares com boa gama de doses e n.º adequado de participantes bem caracterizados, preferencialmente multicentrado.	1
	Outros estudos de limiar.	2a
	Casos reportados descrevendo as reacções a doses baixas, com evidências bem documentadas da dose.	2b
	Casos reportados descrevendo as reacções a doses baixas, com evidências bem documentadas da dose.	3
Severidade	Estudos sistemáticos demonstrando os limiares para as reacções de diferente severidade (por exemplo: objectivo subjectivo em função de ligeiro).	1b
	Série de pacientes demonstrando reacções a diferentes doses, preferencialmente nos mesmos indivíduos.	2
	Casos reportados demonstrando reacções a diferentes doses.	3
	Dados dos pacientes registados com reacções severas.	3-4
	Histórico de utilização segura.	4
Prevalência	Estudos epidemiológicos em populações definidas, incluindo a verificação de IgEs e DBPCFC.	1a
	Igual ao anterior, mas sem DBPCFC.	1b
	Estudos epidemiológicos baseados nos questionários validados.	2
	Vigilâncias de pacientes clínicos alérgicos e outros subgrupos.	3
	Registos de reacções alérgicas severas.	3

Ambos os critérios abaixo devem ser satisfeitos, isto é, deverá existir um alimento que possa causar a formação de anticorpos IgE e uma reacção adversa deverá ser mediada por IgE; a) Desafio oral DBPCFC; b) Desafios abertos para as crianças.

No entanto, pode ser difícil recrutar um número suficiente de pessoas que sejam representativas da população como um todo. A dose de eliciação (*ED*) à qual 5% (*ED*5) ou 10% (*ED*10) da população poderia eventualmente reagir, pode ser estimada através de curvas de distribuição para a dose testada, tal como se pode verificar na figura 4.2. [182].

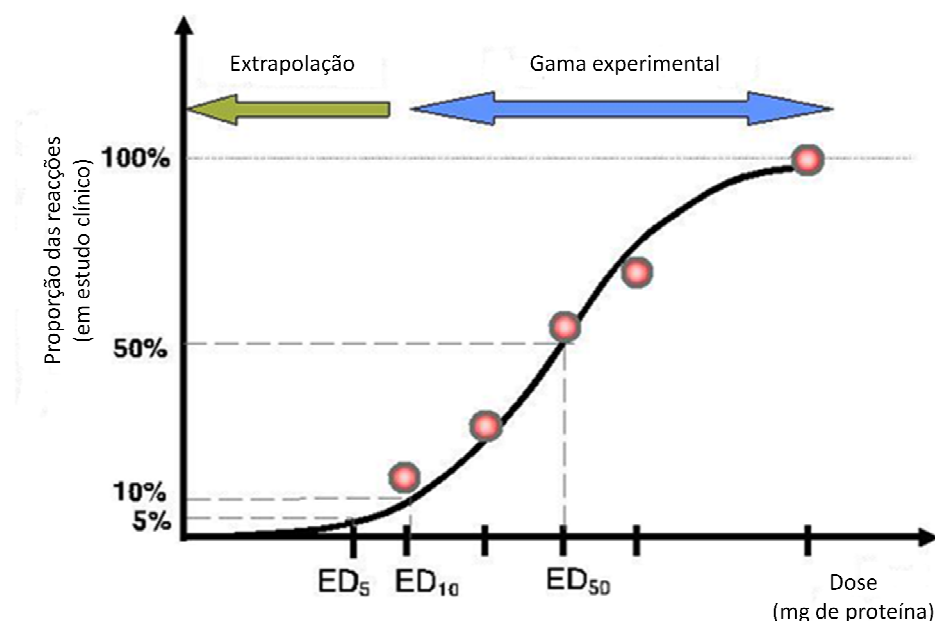


Figura 4.2. - Ilustração da relação genérica entre a dose de proteína alergénica e a frequência de reacções adversas em estudos clínicos de desafio. Uma dose teórica de elicitação (*DE*) pode ser extrapolada a partir do gráfico de respostas experimentais a uma gama de doses de desafio padrão (adaptado de: [168]).

A relação entre a dose e a severidade das reacções é em grande parte desconhecida. Numa revisão de prontuários de 538 desafios de diagnóstico, Perry et al. [8] constataram que as doses acima de 100 mg estavam ligadas a reacções graves. No entanto, um número de outros estudos e relatos de casos indicam que podem ocorrer reacções graves bem abaixo de 100 mg [183,184].

O potencial de alergenicidade é determinado pela quantidade de proteína e de derivados péptidos presentes no produto final [172]. Por exemplo, o óleo de soja altamente refinado pode ser considerado relativamente seguro para indivíduos alérgicos à soja [185] dado que nenhum ou níveis muito baixos de proteína estarão ainda presentes [78]. A natureza da proteína a partir da fonte alérgica também pode ser significativa. A gelatina de peixe é um produto à base de proteína de colagénio derivada de peixe, que tem demonstrado ser segura para os indivíduos com alergia ao bacalhau [184, 186].

O processamento alimentar reduz na maioria das vezes, mas, em alguns casos, aumenta a potência alérgica por desnaturação, desaminação ou por alteração da estrutura química proteica [187]. A alteração da estrutura dobrável da proteína pode revelar ou criar novos epítomos [188].

4.4. Prevalência e incidência

A prevalência das alergias na população é determinada em estudos baseados em amostras representativas da mesma. Os ensaios clínicos são limitados neste aspecto, pois são executados em grupos de pacientes dos quais é difícil tirar conclusões quantitativas sobre toda a população. No entanto, eles fornecem informações sobre os níveis e tipos de sensibilidade entre certos indivíduos, assim como a severidade das reacções, podendo ser utilizados para classificar os alimentos alergénicos [168].

A prevalência da sensibilização é estabelecida pela presença de testes subcutâneos positivos (*SPT*) e/ou de anticorpos séricos de IgE específica para certo alergénio, em estudos representativos da população. No entanto, uma vez que muitos dos reagentes utilizados *in vitro* e *in vivo*, para a detecção dos anticorpos IgE, específicos, estão mal uniformizados e falta-lhes sensibilidade e especificidade, as estimativas da prevalência podem ser incorrectas [168]. No entanto, Sampson [189] alerta para o facto de que a relação entre a sensibilização e a AA manifestada clinicamente não é directa, pelo que vários indivíduos com a IgE podem tolerar bem alimentos aos quais são sensíveis.

Segundo Østerballe et al. [190], as estimativas da prevalência das AAs em toda a população podem ser baseadas em: relatos individuais de alergia; alergia diagnosticada pelo médico com base na história clínica; teste de DBPCFC e presença de estudos de anticorpos de IgE numa amostra populacional representativa. Muitas vezes, são utilizadas combinações destas abordagens. O DBPCFC, com a confirmação da presença de IgEs específicas para o desafio do alimento em causa, é o mais preciso e fornece provas definitivas, mas é dispendioso e de difícil aplicação para poder ser usado em grandes estudos. Por isso apenas alguns foram efectuados, por exemplo, no Reino Unido [191], na Dinamarca [192] e Alemanha [193]. Actualmente a informação disponível sobre os alimentos mais alérgicos foi recolhida tendo como base estudos populacionais realizados em centros clínicos. No entanto esses dados não fornecem informações precisas sobre a prevalência na população em geral. Contudo, os dados sobre as AAs são muitas vezes considerados como menos fiáveis e a prevalência é sobrestimada. Sicherer et al. [194, 28] concluíram que os inquéritos telefónicos, quando bem conduzidos, podem fornecer melhores estimativas da prevalência das alergias do que os *SPT* ou as análises do soro. A tabela 4.2. descreve as fontes de dados de prevalência e atribui peso aos diferentes tipos de prova.

4.5. Caracterização do risco

De acordo com Wensing et al. [195], a gama de sensibilidade de qualquer alergénio alimentar é muito ampla dentro de uma população. A grande maioria (> 95%) não é alérgica e não irá sofrer qualquer reacção, independentemente da quantidade consumida. A maioria dos indivíduos alérgicos é apenas moderadamente sensível, enquanto um pequeno número será extremamente reactivo e poderá enfrentar reacções anafilácticas após a exposição, mesmo a quantidades muito baixas [196]. Cada indivíduo irá variar a sua dose mínima de eliciação ao longo do tempo e consoante as circunstâncias. Assim, a sensibilidade pode aumentar devido a infecções, doenças (asma mal controlada), *stress*, álcool, certos medicamentos, exercício e possivelmente também a factores hormonais. A matriz em que o alergénio está presente também pode afectar a resposta de alguns indivíduos. Por razões desconhecidas, a sensibilidade diminui com o tempo em muitos indivíduos, enquanto em algumas pessoas pode aumentar [168].

4.6. Exposição

A exposição inadvertida aos alergénios pode ocorrer de duas formas: através de ingredientes adicionados deliberadamente, que não são rotulados, ou através da presença accidental do alergénio provocada por operações na cadeia de abastecimento. A maioria da legislação especificamente direccionada para alergénios visa assegurar que, quando estes são adicionados deliberadamente, sejam sempre declarados, embora os gestores de risco devam também considerar a exposição accidental. A tabela 4.3. fornece uma lista não exaustiva de considerações sobre a exposição [168].

Tabela 4.3. - Factores a considerar na avaliação de risco da exposição a um alimento alergénico (adaptado de: [168]).

Utilização do alimento	Comum, rara, novo uso
Forma do alergénio no alimento	Hidrolisada, desnaturada, nativa
Quantidade de proteína e de derivados peptídicos presente no ingrediente	Estudos analíticos em amostras representativas, estabelecendo a quantidade de alergénio/proteína ou derivados péptidos presente no ingrediente Impacto dos processos de refinação
Evidências do impacto do processamento	Aumento ou decréscimo da potência do alergénio Geração de neo-alergénios
Alergénios “escondidos”	Não são facilmente reconhecíveis como constituinte

	do alimento A partir de um contacto cruzado inadvertido
Reactividade cruzada	Alergénio presente num alimento que reage de forma cruzada com um outro ao qual o consumidor é sensível

(Cont.)

Os indivíduos alérgicos vão reagir se forem expostos a uma quantidade de alimento alérgico que exceda o seu limite pessoal. A avaliação de risco precisa de se focar na quantidade ingerida de uma só vez, em vez de exposições contínuas a baixas doses, em contraste com a avaliação de risco clássica para outros constituintes dos alimentos. O consumo *per capita* e o número total de consumidores irá afectar o número potencial de indivíduos reactivos sendo, por isso, importante para a gestão de risco. Mais significativo e desafiante para o gestor de risco é assegurar que uma pessoa alérgica pode evitar a exposição ao alergénio em questão, evitando a presença inesperada ou inadvertida num alimento [168].

A "exposição accidental ou escondida" relaciona-se com a presença inesperada de um alergénio num produto alimentar com o qual o indivíduo pode não estar familiarizado. Por exemplo, leite, soja, trigo ou a proteína de ovo podem estar presentes numa salsicha de carne ou a caseína pode ser utilizada como aglutinante em conservas de peixe. Além disso, os ingredientes originais podem ser substituídos por um tradicional, por exemplo, as proteínas do tremço e da ervilha são utilizadas como substitutas da de soja. A presença inadvertida de um alergénio também pode ocorrer devido a um contacto cruzado que surja em qualquer ponto da cadeia de abastecimento [197, 198, 199, 200]. Em contrapartida, alguns alimentos alérgicos, como por exemplo o pêssego, kiwi e maçã, são normalmente facilmente reconhecíveis e não exigem rotulagem ou outras estratégias de gestão de risco. Embora algumas frutas possam causar reacções graves e conter alergénios termoestáveis, por exemplo, nos concentrados de fruta [201], a exposição pode ser evitada facilmente, seja porque são visualmente reconhecíveis ou porque deverão estar devidamente identificadas no rótulo.

4.7. Aplicação dos critérios

A primeira etapa para avaliar as evidências disponíveis implica decidir se o alergénio em questão causa realmente a alergia alimentar (mediada pela IgE), tal como é indicado na tabela 4.1. Conforme descrito na secção clínica, o nível de informação disponível para a maioria dos alimentos suspeitos só permite classificar 3 ou 4, dado que os relatórios clínicos provavelmente

só irão incluir um número limitado de estudos de caso. No entanto, se este critério for cumprido, mesmo a um nível baixo de evidência, a avaliação de risco deve avançar para os outros critérios descritos. Se, por outro lado, os critérios clínicos não forem satisfeitos, não há necessidade de continuar a avaliar o alimento [168].

A segunda etapa será avaliar todos os outros critérios e ponderar as evidências (tabelas 4.2. e 4.3.). A ausência de dados que suportem qualquer um dos critérios não exclui esse alimento de ser um potencial alérgico de importância para a saúde pública [168]. A figura 4.3. ilustra como é que os dois principais factores considerados (na tomada de decisão se um alimento alérgico é de facto importante, na perspectiva da saúde pública) podem influenciar a tomada de decisão da gestão de risco.



Figura 4.3. – Representação teórica do agrupamento de alimentos feito pela avaliação de risco, quando se decide se um alimento alérgico é importante na perspectiva da Saúde Pública. A divisão em grupos é arbitrária. O eixo do Y representa a magnitude da probabilidade de ocorrer uma reacção adversa, enquanto o eixo do X representa a magnitude da potência alérgica como um rácio entre a severidade da reacção adversa e a potência da dose necessária para provocar a reacção (adaptado de: [168]).

5. Classificação/ Propriedades Moleculares dos Alergénios

Segundo Kumar et al. [33] os alimentos contêm uma grande variedade de proteínas, no entanto, apenas algumas são alergénicas. A razão pela qual algumas proteínas são altamente alergénicas e outras não não é plenamente conhecida, mas certas propriedades químicas e físicas parecem estar associadas com um potencial alergénico. A maioria dos alergénios possui 10-70 kDa e são tipicamente estáveis às alterações do pH, calor e digestão. Eles são geralmente solúveis em água possibilitando a absorção através do trato gastrointestinal. Contudo, muitos alergénios não têm essas propriedades; por exemplo, as profilinas não são estáveis à digestão e as *LTPs* não têm um ponto isoeléctrico ácido. Por esse motivo, têm sido realizadas várias tentativas para classificar os alergénios alimentares de origem vegetal e animal em função da sua estrutura tridimensional, função biológica ou famílias de proteínas.

Os alergénios são proteínas que, com base na sua semelhança estrutural, são agrupadas em diferentes famílias. Consoante as suas propriedades, a sensibilização aos componentes leva a diferentes consequências para o doente. Cada fonte de alergénio contém componentes específicos e de reactividade cruzada. Estes são mais ou menos exclusivos da fonte, encontrados apenas num número limitado de espécies relacionadas. Cada fonte de alergénios pode conter um ou alguns componentes específicos de alergénios. A sensibilização a qualquer um deles indica uma sensibilização genuína, o que significa que a fonte correspondente é a causa principal dos sintomas clínicos [202].

Os constituintes dos alergénios de reactividade cruzada estão mais repartidos e podem ser divididos por uma vasta gama de fontes. Devido à grande semelhança estrutural, podem provocar reactividade cruzada com os anticorpos IgE. A reactividade cruzada pode ser exemplificada com a AA relacionada com o pólen de bétula, uma síndrome que afecta muitos doentes alérgicos a este tipo de pólen. O motivo molecular subjacente a esta reactividade cruzada é o facto de a maior parte dos pacientes terem anticorpos IgE específicos do componente *Bet v 1*. O *Bet v 1* tem uma semelhança estrutural a proteínas relacionadas de vários alimentos, por exemplo a soja e o amendoim. Assim, as IgEs do doente para a *Bet v 1* da bétula têm uma reacção cruzada com as proteínas da soja ou do amendoim [202].

Os componentes alérgicos dos alimentos apresentam diferentes estabilidades ao calor e à digestão e o respectivo conteúdo na fonte varia. Tanto a estabilidade como a quantidade são reflectidas pela família proteica a que pertence o componente. Assim, conhecendo o perfil de

sensibilização do doente e a que família pertencem os componentes identificados, é possível avaliar o risco associado às sensibilizações [202].

A identificação e a purificação de alergénios têm sido essenciais para os estudos estruturais e imunológicos necessários para entender como estas moléculas estimulam a formação dos anticorpos de IgE [202]. Nos últimos anos, foram identificados vários compostos que estimulam a produção de IgE e causam doenças nos humanos, cuja origem está directamente relacionada com esta.

Actualmente existe uma quantidade significativa de informação sobre a identificação e purificação de alergénios a partir de uma ampla variedade de fontes, incluindo alimentos, pólen, ácaros das poeiras, pelos de animais, insectos e fungos [202]. A maioria dos compostos são proteínas ou glicoproteínas facilmente solúveis em solução aquosa.

Estas propriedades parecem permitir uma penetração rápida dos alergénios nas membranas mucosas, facilitando os sintomas imediatos observados nos pacientes. Apesar do crescente conhecimento das sequências de aminoácidos e estrutura dos alergénios identificados, as características específicas associadas com a formação dos anticorpos de IgE não foram ainda determinadas [202].

Os alergénios alimentares, em geral, têm as propriedades de qualquer composto que irá estimular a produção de IgE. Em comparação com os inalados, apenas alguns, os causadores de reacções mediadas por IgE, foram identificados e purificados [202, 203]. São compostos tipicamente de baixo peso molecular (<70 kDa) com pontos isoelectrónicos ácidos que são muito abundantes na fonte de alimento. Estas moléculas são normalmente resistentes a proteases, ao calor e aos desnaturantes, permitindo que resistam à degradação durante a preparação dos alimentos e a sua digestão [204].

Os alergénios vegetais pertencem a um número bastante limitado de famílias de proteínas e também são caracterizados por um número de propriedades físico-químicas e bioquímicas, muitas das quais são também partilhadas pelos de origem animal. Estas incluem a estabilidade térmica e a resistência à proteólise, que são reforçadas pela capacidade de se unirem a iões ligantes tais como os iões metálicos, lípidos ou esteróides. Outros tipos de interações lipídicas, incluindo as membranas ou outras estruturas lipídicas, representam outra característica que pode promover as propriedades alérgicas. Uma característica estrutural claramente relacionada com a estabilidade são as ligações intramoleculares de dissulfureto, juntamente com modificações pós-translacionais, tais como a N-glicosilação. Alguns compostos vegetais, tais como as prolaminas de armazenamento das sementes de cereais, são proteínas reomórficas com cadeias polipeptídicas que adoptam um conjunto de estruturas secundárias que se assemelham a proteínas desdobradas ou parcialmente dobradas. Outras moléculas vegetais

são caracterizadas pela presença de estruturas repetitivas, a capacidade de formar oligómeros e a tendência para se agregarem. Apesar de ainda não ser possível prever na totalidade a alergenicidade de uma determinada proteína alimentar, a compreensão das propriedades moleculares que podem predispô-la a tornar-se alérgica é um primeiro passo importante e contribuirá, sem dúvida, para que o processo integrado de avaliação do risco alergénico seja adoptado pelas entidades [205].

Actualmente, a lista de alergénios da subcomissão de nomenclatura de alergénios da União Internacional de Sociedades de Imunologia (*IUIS*) dispõe de 130 alergénios alimentares derivados de vegetais. Com base na homologia de sequências, estes alergénios podem ser classificados em apenas 27 das 9.000 famílias de proteínas conhecidas de acordo com o banco de dados “*Allfam*”. Essas famílias compreendem as prolaminas e as cupinas, proteínas relacionadas com a patogénese (*PRs*), profilinas, proteínas como a taumatina, oleosinas, expansinas, uma série de enzimas e inibidores de proteases, entre outros. A classificação segundo as semelhanças estruturais e, portanto, bioquímicas e funcionais, irá proporcionar uma nova perspectiva sobre as moléculas e pode contribuir para responder à pergunta sobre a alergenicidade de diferentes proteínas. Isso irá, certamente, ajudar a definir moléculas alergénicas clinicamente relevantes e explicar os fenómenos de reacções cruzadas entre as fontes alérgicas individuais, bem como entre os alergénios alimentares e moléculas alérgicas de outras origens (por exemplo do pólen) [206].

5.1. O factor abundância

As sementes e nozes contêm proteínas de armazenamento que podem contabilizar 50% ou mais do total proteico do órgão. A maioria dos alergénios que sensibilizam pela via gastrointestinal está presente em pelo menos 10% do conteúdo total proteico dos alimentos [207]. Contudo, algumas das proteínas que estão presentes em todas as plantas em grandes quantidades, tais como a enzima carboxilase da Ribulose -1, 5 – bifosfato, que contabiliza 30-40% do total proteico das folhas, nunca foram mencionadas como alergénios. Em contraste, as *nsLTPs* são alergénios potentes, mas não são muito abundantes. Assim, o conteúdo proteico por si só não explica a alergenicidade. Embora a abundância seja um factor importante, contribui provavelmente de forma secundária para a estabilidade da proteína [33].

5.2. Ligações aos iões ligando

Vários alergénios são capazes de se unir a iões ligantes (variando entre os iões metálicos), esteróides e vários tipos de lípidos. Certos ligantes, tais como estes iões, são assimilados pela estrutura tridimensional de uma proteína, sendo frequentemente incorporados no interior da molécula. A perda de um ião de metal normalmente perturba a conformação estrutural das proteínas, provocando um aumento na mobilidade do polipéptido e uma transição, em alguns casos, para uma forma parcialmente dobrada. Algumas proteínas formam uma cavidade, outras possuem um túnel no qual os ligantes se ajustam, ao passo que outras se unem aos ligantes através de interacções superficiais [5]. A ligação do ligante pode reduzir a mobilidade do polipéptido, aumentando tanto a estabilidade térmica como a resistência à proteólise, tal como acontece em muitas proteases que necessitam de flexibilidade, quando usam proteínas como substrato. Proteínas, tais como as lipocalinas e as *nsLTPs*, que possuem uma bolsa de ligação lipídica, demonstram maior estabilidade quando esta é ocupada. Assim, a estabilidade térmica da β -lactoglobulina (*BLG*) aumenta em ligações lipídicas [208], tal como se verifica nas *nsLTPs* do trigo [209].

A figura 5.1. representa as ligações de proteínas com iões ligando.

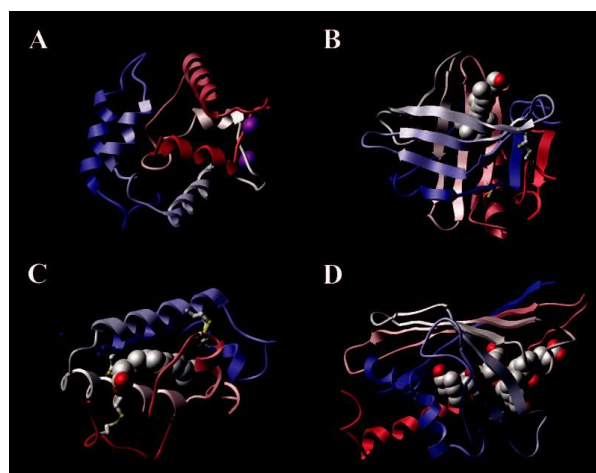


Figura 5.1. – União com o ligante. Representações das cadeias dos alergénios por um gradiente de cor azul-vermelho a partir do terminal N para o terminal C, com os ligantes e as ligações dissulfureto representados por: A = Parvalbumina da carpa, com os 2 locais de cálcio em roxo; B = Globulina de bovino, *Bos d 5*, com retinol ligado (*IGX8*); C = *nsLTP* do milho, *Zea m 14*, com um único ácido palmítico ligado (*1 MZM*); D = pólen alérgénico da bétula, *Bet v 1*, com 2 moléculas de desoxicolato (*1FM4*) (fonte: [205]).

5.3. Estabilidade ao processamento e digestão

A estrutura tridimensional molecular, as ligações dos iões ligando, as pontes de dissulfureto e as glicosilações constituem factores relevantes, para a resistência à desnaturação pelo processamento alimentar e para as condições adversas do trato gastrointestinal [33].

Para além dos aspectos já abordados, as ligações por pontes de dissulfureto (intra e intermoleculares) condicionam a estrutura tridimensional, quer a sua quebra seja térmica ou feita por químicos, tornando-a limitada ou reversível. Alguns alergénios de origem vegetal têm um número elevado destas ligações, como por exemplo a família das prolamínas (albuminas 2S, inibidores da α -amilase/tripsina, *nsLTPs*), as *PRs* (quitinases, taumatinas). As N-glicosilações também têm um efeito significativo na estabilização da estrutura [33].

Têm sido feitos ensaios de digestão *in vitro* com fluido gástrico de simulação (*SGF*), para caracterizar proteínas, com o intuito de prever o efeito da proteólise do estômago nos compostos da dieta. A digestão gástrica diminui bastante o potencial das proteínas se ligarem à IgE, o que aumenta a dose do alergénio necessária para despoletar os sintomas nos pacientes. A estabilidade à digestão tem sido considerada como uma das propriedades partilhadas pelos alergénios. A resistência proteica à digestão pela pepsina foi ainda proposta como um indicador do potencial alergénico, visto que parece ser uma característica partilhada por muitos [33].

Vários são os exemplos de compostos que demonstraram serem estáveis às condições que simulam a digestão humana. Como exemplos destaca-se a β -lactoglobulina do leite, a β -conglícinina (β -subunidade), *Gly mI*, os inibidores da tripsina, a lecitina da soja, tropomiosina do camarão, a *Pn lectin* do amendoim, a ovalbumina e conalbumina do ovo [210], feijão vermelho [211].

O processamento térmico pode alterar (diminuir ou aumentar) a alergenicidade de uma proteína, mas o efeito geral num alergénio não pode ser previsto [212]. Além disso, podem ocorrer interações com outros constituintes da matriz alimentar e não terem nenhum efeito na alergenicidade global do alimento. Pastorello et al. [213] estudaram uma proteína *LTP* (lipid transfer) do milho e não observaram nenhuma perda da capacidade de ligação à IgE, depois de um tratamento térmico a 100°C durante 160 minutos. Wigotzki et al. [214] também demonstraram que o processamento seco a 100°C durante 90 minutos não tinha efeito na alergenicidade de algumas proteínas da avelã, sugerindo a existência de algumas muito termoresistentes.

5.4. Glicosilação

Muitas proteínas extracelulares sofrem glicosilação durante a sua passagem através do retículo endoplasmático. A actividade imunológica da IgE dirigida contra a porção carboidratada dos glicoalergénios tem sido tema de debate desde a descoberta da IgE específica com a cadeia do N-glicano [215]. Estes anticorpos glicídicos dos pacientes com alergia ao pólen têm uma reactividade cruzada com virtualmente todos os alimentos vegetais, sem os pacientes demonstrarem sintomas clínicos. A IgE específica carboidratada foi mencionada por induzir *in vitro* a libertação da histamina basofílica para o *Lyc e 2* [216], um glicoalergénio do tomate, tal como para o *Api g 5*, referente ao tubérculo do aipo [217].

Para além das implicações imunológicas, a glicosilação também afecta as propriedades biológicas dos alergénios. A N-glicosilação pode ter um efeito significativo na estabilização da estrutura proteica, existindo evidências de que aumenta a estabilidade e a resistência à desnaturação química, por exemplo, da globulina 7S da pêra [218]. As globulinas 7S de armazenamento das sementes são normalmente glicosiladas, tendo entre um a dois locais de N-glicosilação localizados no terminal C. Por exemplo, a globulina 7S do amendoim (*Ara h 1*) tem um local de ligação carboidratado, com a ligação a ser feita através do aminoácido asparagina [219].

As globulinas 11S raramente são glicosiladas, sendo uma excepção a lupina, na qual a maior subunidade ácida se torna glicosilada [220].

5.5. Estruturas repetitivas, agregados e “glycation”

A presença de estruturas repetitivas e a propensão para a agregação, quer sobre condições fisiológicas ou como resultado das condições de processamento alimentar, podem afectar a sensibilização e a agregação, pelo menos reforçando a imunogenicidade [221]. O potencial de elicitação de reacções também pode ser aumentado através do aumento da valência do epítipo da IgE, e por conseguinte, da capacidade de libertação de histamina pelos mastócitos. Parece que os agregados são capazes de quebrar a tolerância às proteínas recombinantes autoterapêuticas, tais como a *IFN-α* [222].

Os alergénios alimentares com estruturas repetitivas incluem as tropomiosinas do marisco e as prolaminas de armazenamento das sementes, onde muitas são capazes de formar agregados.

As tropomiosinas são uma família de proteínas bastante correlacionadas, presentes nas células musculares e não musculares, e juntamente com a actina e a miosina desempenham um papel regulatório na contracção muscular [223]. As estruturas repetitivas são uma característica

de muitas proteínas reomórficas, sendo que as prolamínas exibem provavelmente as sequências de repetição mais degenerativas. Estas são baseadas em vários núcleos curtos, com um comprimento de 4 a 8 resíduos, que são ricos em prolina e glutamina. Estudos de absorção de massa demonstraram que esses resíduos podem ser altamente específicos para certos núcleos, mas continuando a ligar-se aos polipéptidos de prolamínas que também contêm núcleos repetitivos [224].

As globulinas partilham a tendência para formarem grandes estruturas de trímeros, hexâmeros e dodecâmeros (*11S* da soja) em meios equilibrados de sal, que são agregadas por interações não covalentes [225]. Uma das suas características é a capacidade de formar redes de gel depois de um tratamento térmico húmido como a fervura. As globulinas *11S* e *7S*, tais como outras cupinas, são termoestáveis. Assim, as *7S* têm a sua desnaturação por volta dos 70-75°C e as *11S* desdobram a temperaturas >94°C. Parece que a estrutura em β -barril permanece intacta, mas o desdobrar de outras regiões dos polipéptidos provoca a perda da estrutura quaternária, com a resultante formação de grandes agregados. Quando estes agregados se tornam suficientemente grandes, irão formar precipitados floculantes, ou, a concentrações proteicas elevadas de 5-10%, agregados similares aos das redes gelificantes [226, 227].

Ao contrário da soja e das lentilhas, os amendoins e outros frutos secos são sujeitos a processos térmicos de baixa humidade, tais como a torrefacção. Isto afecta a estabilidade proteica porque a desnaturação necessita da presença de água, levando as proteínas a tornarem-se mais termoestáveis em sistemas deste tipo. Por exemplo, o alergénio *Ara h 1* apenas se torna desnaturado nos amendoins torrados a 140°C após 15 minutos [228]. Isto acontece provavelmente devido à modificação covalente durante as reacções de *Maillard*. Os açúcares reagem com os grupos amina livres das proteínas para formarem os compostos de *Amadori*, que depois se rearranjam para produzir uma gama de aductos, conhecidos como produtos finais de glicação ou glicosilação. Para além disso, estes também se formam ao longo do “envelhecimento” dos alimentos [205].

Estes produtos conseguem desestabilizar a estrutura quaternária proteica, tal como reduzir a estabilidade da hélice tripla do colagénio a um pH baixo [229].

Há indicações de que as reacções de glicação poderão ser as responsáveis pelo aumento da actividade alérgica dos amendoins depois dos processos de cura ou torrefacção [230, 231].

Os tratamentos térmicos também podem provocar trocas de dissulfureto, modificações de outros aminoácidos e reacções cruzadas [205].

Parece que, quer os alergénios que se pensava que sensibilizavam apenas através do trato gastrointestinal, quer as proteínas desnaturadas, conseguem manter a reactividade à IgE. Isto implica que, ou contêm muitos epítomos termoestáveis, ou os indivíduos têm respostas mediadas pela IgE em primeiro lugar, face aos epítomos curtos encontrados no material cozinhado. A

presença destas grandes estruturas agregadas nos alimentos, tal como são consumidos, pode potenciar as suas propriedades alérgicas [5].

5.6. Interação com membranas e outras estruturas lipídicas

Muitos dos alergénios são capazes de se ligar às membranas celulares ou a outro tipo de estruturas lipídicas dos alimentos, ou mostram uma propensão para se agregarem como resultado do processamento alimentar. A albumina 2S da mostarda demonstrou interagir com vesículas fosfolipídicas [232]. Isto levou à proposição de que tais interações poderão afectar a absorção e processamento do alergénio no trato gastrointestinal, indicando que a actividade biológica desta proteína desempenha um papel na atenuação do seu potencial alérgico. Similarmente, há evidências de que as *nsLTPs* também podem interagir com estruturas lipídicas [205].

5.7. Reactividade cruzada

A designação “alergia cruzada” refere-se às reacções cruzadas entre os diferentes alimentos e às reacções entre os alimentos e outros itens não alimentares [33].

Os indivíduos que reagem aos alergénios específicos dos alimentos, aos inalantes ou a outras substâncias, podem desenvolver alergia a outros compostos, e tem-se verificado que estas reacções estão a ocorrer em diferentes alimentos que contêm o mesmo alergénio, ou um outro com uma estrutura proteica muito similar. Estas são conhecidas como a *reactividade cruzada alérgica* [233].

Isto significa que alguém pode sofrer uma reacção alérgica, mesmo estando a evitar os alimentos aos quais é alérgica. Se for alérgica ao amendoim, pode vir a reagir à soja, às ervilhas, lentilhas ou feijões que são da mesma família biológica. Também podem ocorrer entre certos frutos ou vegetais e o látex (síndrome da fruta-latex), ou o pólen da febre do feno. Se uma pessoa apresenta uma reacção mensurável a um determinado alimento, através de um diagnóstico clínico, deve ser aconselhada a evitar alimentos similares que poderão despoletar essa reacção [233].

A reacção cruzada mais bem estudada é a que ocorre entre a maçã e o pólen da bétula. Não obstante, indivíduos alérgicos à maçã não são necessariamente alérgicos ao pólen. Esta reactividade não deve ser logo assumida e alimentos importantes não devem ser excluídos da dieta sem os respectivos testes e diagnóstico clínico [233].

Uma grande variedade destes alergénios, quer de origem vegetal (ex: profilinas e *nsLTPs*), quer de origem animal (ex: tropomiosinas e caseínas), tem sido caracterizada [234].

Em alguns estudos os pacientes alérgicos às lentilhas apresentaram reacções cutâneas ao grão-de-bico (67-80%), ervilhas (22-54%) e ao feijão verde (11%). Os alérgicos ao grão-de-bico apresentaram sinais clínicos quando foram expostos oralmente às lentilhas (84%), ervilhas (68%) e aos amendoins (10%) [235]. Uma família de proteínas que reage de forma cruzada com os alergénios do pólen é a das profilinas. Frutos como a cereja (*Pru av 4*), pêra (*Pyr c 4*) e o aipo (*Api g 4*) reagem cruzadamente com o pólen da bétula (*Bet v 2*) e podem causar sintomas nos pacientes sensíveis [139]. A similaridade antigénica entre as proteínas do leite de vaca, cabra, ovelha e de égua significa que quase todos os sujeitos que são alérgicos à proteína do leite de vaca, também o são aos outros tipos de leites. Todos os ovos de peru, pato, ganso e gaivota contêm a ovalbumina, ovocumóide e a ovotransferrina, os maiores alergénios no ovo da galinha [33]. A reactividade cruzada à tropomiosina de algumas espécies de moluscos tem sido observada no soro de pacientes alérgicos às ostras, sugerindo que os indivíduos alérgicos aos moluscos devem evitar comer qualquer espécie de molusco [132].

A tabela 5.1. (Anexo X) apresenta uma série de exemplos de reactividades cruzadas entre alimentos e outros agentes vegetais ou animais.

5.8. Classes de alergénios alimentares

De acordo com o quadro clínico, padrão de alergénios e os mecanismos imunológicos envolvidos, existem duas classes de alergénios alimentares.

Na Classe I a sensibilização ocorre no trato gastrointestinal. Os alergénios que despoletam estas reacções têm uma particular resistência à digestão gástrica [236] e são termoestáveis. Estas alergias são raras nos adultos. Contudo, a AA é tipicamente uma das primeiras manifestações da síndrome atópica e afecta as crianças pequenas. As mais importantes são as do leite de vaca, ovo da galinha, amendoim, peixe, marisco e a dos legumes. Estas manifestações na sua maioria desaparecem durante a infância e são substituídas por outras da mesma síndrome [237].

A Classe II é maioritariamente observada em adultos e desenvolve-se como consequência de uma sensibilização provocada pela inalação de alergénios. A base imunológica desta alergia é a reactividade cruzada da IgE, que se pode manifestar clinicamente ou ser irrelevante [238, 239]. Os alergénios que provocam estas reacções não possuem determinadas características físico-químicas tão óbvias como na Classe I, como é o caso do pólen da bétula. De acordo com o seu comportamento durante a digestão, podem causar sintomas que vão desde a síndrome

alérgica oral (*OAS*) (ex: bétula-maçã) até ao choque anafilático (ex:síndrome de mugwort da cevada) [240,241].

6. Métodos Analíticos para Avaliação de Alergénios

A incidência das alergias alimentares tem aumentado ao longo dos anos, tornando-se um problema de saúde pública, especialmente nos países desenvolvidos. Essa ocorrência, que representa um desafio para a segurança alimentar, tem levado à necessidade de desenvolver métodos seguros e eficazes de detecção desses alerígenos [242]. Neste contexto existe uma necessidade urgente de melhorar a robustez dos métodos analíticos disponíveis e desenvolver novos métodos padronizados, para fornecer um instrumento adequado para que a indústria alimentar possa produzir alimentos "isentos de alerígenos" para os consumidores detentores de alergias. Os novos testes melhorados devem ser rápidos, mais sensíveis (limite inferior de detecção, *LOD*), mais precisos (melhor limite de quantificação, *LOQ*) e mais específicos para melhorar o grau de confiança na distinção de sequências similares de proteínas alergénicas, devendo, idealmente, permitir a identificação inequívoca dos compostos [242].

6.1. Métodos de análise qualitativa e quantitativa

A detecção pode ser efectuada com recurso a várias abordagens e técnicas analíticas, que variam consoante os objectivos propostos, a complexidade da matriz a analisar e o equipamento disponível para efectuar as análises, entre outros factores. Tanto a indústria alimentar como as instituições reguladoras recorrem a métodos de rastreio para obter resultados mais rápidos e de menor custo, enviando para laboratórios especializados as análises mais complexas que requeiram equipamentos mais sofisticados e dispendiosos. O diagnóstico de uma AA baseia-se em diversos instrumentos de detecção indirecta, utilizando as propriedades do soro sanguíneo. O sangue de doentes alérgicos contém o anticorpo IgE que se liga ao antígeno (alerígeno). Assim, a maioria das ferramentas de diagnóstico são baseadas na detecção imunoquímica de IgE, receptores ou ainda mediadores. Por outro lado, para evitar a contaminação da cadeia alimentar, têm sido desenvolvidos métodos de detecção nos alimentos [242].

6.1.1. Métodos de detecção e quantificação de alergénios

No que concerne à detecção/quantificação de alergénios, a maior parte das abordagens tradicionais baseia-se na detecção de DNA ou de proteínas na amostra, motivo pelo qual a espectrometria de massa tem sido largamente utilizada. No caso das proteínas incluem-se a imunodetecção, o teste enzimático (*EAST*) ou o radioalergoabsorvente (*RAST*), entre outros. Para o caso do DNA utilizam-se a *PCR* (reação em cadeia da polimerase) e a *PCR* em tempo real. Considerando que a maioria dos alergénios são proteínas, alguns dos métodos baseados nestas, como os imunoensaios, utilizam anticorpos específicos para essas moléculas. O ensaio de imunoabsorção enzimática (*ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), feito em placas de 96 poços, é rotineiramente utilizado para a sua detecção, pois consegue detectar cada composto individualmente [243].

Monaci e Visconti [244] descreveram todos os aspectos dos métodos baseados na separação e na espectrometria de massa (*MS*), que permitem a identificação e caracterização de proteínas alérgicas dos alimentos. No entanto, ainda segundo os mesmos autores, existe um método de rastreio rápido, denominado *Swab*, que não se baseia na detecção de DNA ou de proteínas, mas do ATP presente na superfície dos equipamentos. Este método evita que ocorram contaminações cruzadas de alergénios durante a limpeza dos instrumentos de processamento [245].

Os métodos clássicos são procedimentos indirectos de medição dos genes de codificação dos alergénios (*PCR*), dos complexos antígeno-anticorpo (ensaio imunoenzimático, *ELISA*) ou dos mediadores libertados por células (teste de activação de basófilos, *BAT*). Por outro lado, os métodos de espectrometria de massa permitem identificar e quantificar alergénios, independentemente da sensibilidade individual de cada consumidor alérgico ou da utilização de soro. Em princípio, os métodos imunquímicos usados para o diagnóstico podem ser aplicados à detecção e quantificação. Contudo, dentro da gama disponível os ensaios de *ELISA* e de *PCR* são os mais convenientes para os exames de rotina e quantificação na restauração e na indústria, enquanto os outros são actualmente mais aplicáveis no campo da investigação [242].

Seja qual for o método utilizado, importa que seja capaz de detectar e quantificar em matrizes alimentares os vestígios dos vários compostos que são capazes de provocar uma reacção alérgica, cuja gravidade depende da substância em si e do indivíduo. A sua quantificação tem como principal objectivo garantir, com um nível elevado de confiança, a sua ausência nos alimentos para o consumidor alérgico [242].

6.1.2. Métodos de detecção baseados em sequências específicas de DNA

A maioria dos métodos de detecção baseia-se na identificação das proteínas. No entanto, uma tecnologia alternativa recorre à utilização de DNA para a sua detecção. Segundo Diaz-Amigo e Popping [246], este método tem sido usado sobretudo em produtos da agricultura biotecnológica, como forma de comprovar a exactidão dos elementos constantes nos rótulos, assim como o escrupuloso cumprimento da regulamentação. Note-se contudo que este é, no entanto, um método controverso dado que a correlação entre a presença da proteína alérgica e do DNA nos alimentos processados não ser, necessariamente, constante. Segundo os mesmos autores, esta relação pode ser afectada por quatro factores [246]: 1) as condições ambientais podem adulterar o alergénio; 2) durante o processamento dos alimentos podem ocorrer alterações que afectem a proteína e o DNA de forma diferente e em graus variados; 3) tanto as proteínas isoladas, como as fracções proteicas utilizadas para formar o produto podem carecer de DNA; 4) pode ocorrer um efeito de matriz e a interferência de outros componentes do alimento. Neste enquadramento, para se efectuar a extracção do DNA necessário para levar a cabo as análises baseadas neste método, aconselha-se a utilização de matérias-primas em vez de alimentos processados [247].

Segundo Schubert [248], a selecção do método a utilizar para a extracção de DNA deverá ter em linha de conta a densidade do material biológico, o rácio expectável de DNA para a quantidade de material biológico, a eventual presença de inibidores da PCR, assim como o equipamento laboratorial disponível. Para se obter um DNA com um elevado grau de pureza, a amostra deverá ser tratada com K-proteinase e um tampão de EDTA, seguido por uma extracção com fenol e clorofórmio e precipitação do DNA com etanol. Este autor adverte, no entanto, para a existência de várias desvantagens relacionadas com a manipulação de substâncias orgânicas [248]. Após se proceder à extracção de DNA efectua-se uma amplificação do mesmo por *PCR*, com recurso a uma polimerase termoestável. A amostra pode depois ser examinada, sendo eluída por electroforese em gel de agarose e depois revelada com coloração por fluorescência [247].

Segundo Mafra et al. [249], os métodos de aplicação de detecção de sequências codificantes de proteínas alérgicas permitem a análise directa de componentes dos alimentos alérgicos. A detecção da proteína alérgica é realizada através da amplificação do seu fragmento de DNA específico em reacção de *PCR*. Por outro lado, Poms et al. [250] salientam que a reacção de *PCR* possibilita a obtenção de resultados qualitativos que detectam a sequência de codificação para um dado alergénio. Os mesmos autores avançam ainda que o recurso ao *PCR-ELISA* permite obter uma determinação semi-quantitativa, enquanto o *PCR* em tempo real (*RT-*

PCR) permite obter uma determinação quantitativa precisa [250]. Ambos os métodos permitem detectar os alimentos alérgicos, sendo um recurso precioso quando não existe a possibilidade de utilização das abordagens mais precisas do método de ELISA, para confirmar os dados obtidos noutras análises de ELISA ou se for necessário um rastreio múltiplo de vários alimentos alergénicos [251].

6.1.3. *PCR*

A “Reacção em Cadeia da Polimerase” (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) é uma técnica que permite a amplificação *in vitro* de um segmento específico de DNA, através de uma síntese enzimática.

Os reagentes da mistura de reacção são adicionados sequencialmente para um microtubo. Entre eles encontra-se a solução de DNA de dupla cadeia contendo a sequência alvo que se quer copiar. Adiciona-se à mistura uma DNA polimerase especial, termoresistente e responsável pela síntese de novas cadeias, sendo uma das mais conhecidas a *Taq Polimerase*, extraída da bactéria termófila *Thermus aquaticus*. Outros elementos indispensáveis para a síntese de novas cadeias são os quatro tipos de desoxinucleótidos trifosfatados (*dNTPs*) e os *primers*, necessários para iniciar a síntese de uma nova cadeia no local apropriado. Os *primers* são moléculas curtas e sintéticas de DNA de cadeia simples, desenhadas de forma a poderem hibridar por complementariedade com as extremidades do DNA alvo, e assim determinam o segmento particular que vai ser amplificado [252]. Têm normalmente entre 18- 35 bases e só podem ser produzidos quando a sequência-alvo é conhecida. A mistura de *PCR* também é composta por uma solução tampão destinada a produzir as condições adequadas para que as reacções possam ocorrer [247].

O procedimento resume-se a três fases distintas [252], (Fig. 6.1.): na 1ª fase processa-se a desnaturação do DNA através da elevação da temperatura (94°C, durante 30 -120 segundos); na 2ª fase baixa-se a temperatura bruscamente (40-60°C, durante 15-60 segundos) permitindo a ligação (*annealing*) dos *primers* às zonas que ladeiam o DNA a amplificar, um em cada cadeia; na 3ª fase induz-se o aumento da temperatura até se atingir a temperatura óptima da *Taq polimerase* (72°C, durante 1-2 minutos) para que esta comece a adicionar os nucleótidos às extremidades 3' dos *primers*, usando a cadeia de DNA como molde. Dentro de cerca de 5 minutos a sequência alvo de DNA foi duplicada. A mistura de reacção é novamente aquecida, começando um novo ciclo de separação de cadeias, ligação de *primers* e síntese de DNA [252].

Para Broll [253], o magnésio é um elemento essencial das polimerases termoestáveis de DNA, pelo que deve ser utilizado neste ensaio. Para que a amplificação tenha sucesso é

fundamental a concentração deste composto, dado que na ausência da quantidade precisa de iões de magnésio livres, a *Taq polimerase* é totalmente inactiva e o excesso de magnésio faz com que a precisão da enzima seja reduzida, podendo ainda ampliar o nível de amplificação não específica [253].

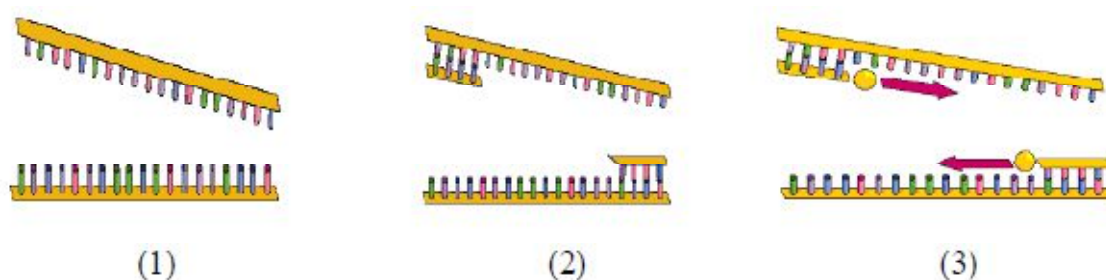


Figura 6.1. - Representação esquemática das três fases da técnica de *PCR*: (1) desnaturação do DNA; (2) arrefecimento e *annealing* dos *primers*; (3) fase de alongamento dos *primers* (fonte: [254]).

Na prática, esta técnica utiliza um aparelho chamado termociclador, onde são previamente programados os tempos e as temperaturas de cada fase de um ciclo. Da mesma forma é programado o número de ciclos que cada protocolo específico utiliza. Geralmente os protocolos utilizam 20-30 ciclos, provocando um aumento de 10^6 a 10^9 unidades da sequência alvo.

Segundo Besler [256], os produtos resultantes são separados de acordo com o seu tamanho por electroforese em gel de agarose. O gel é colorido com um corante fluorescente, o brometo de etídio, o qual se intercala no DNA e adquire um brilho de cor de laranja sob a luz UV. As amostras podem ser identificadas por comparação da sua posição e cor em relação aos padrões. Através da seleção de *primers* pode-se distinguir entre sequências relacionadas minimizando as reacções cruzadas e evitando resultados falso-positivos [256].

Existem muitos pontos críticos na utilização desta técnica, que devem ser afinados no processo de optimização de um protocolo de *PCR*. Entre estes pontos temos a preparação dos reagentes a utilizar (DNA molde, primers, *dNTPs*, iões de magnésio, tampão de reacção e DNA polimerase) e as condições de reacção (as diferentes temperaturas, o número de ciclos, o controlo de contaminações e o rendimento específico).

O método de *PCR* foi aplicado com sucesso na detecção do DNA que codifica as gliadinas da farinha, as proteínas alérgicas da soja transgénica e o alérgénio principal da avelã. Essas determinações são altamente sensíveis, livres de reacções cruzadas e capazes de detectar valores de alérgénios até 0,001% [256]. Para além da maior sensibilidade, o *PCR* exige apenas

alguns minutos e muito pouca matéria-prima, sendo por isso muito mais rápido do que outras técnicas.

Poms et al. [250] referem ainda que este método é altamente específico e sensível, possuindo um *LOD* de menos de 10 mg kg⁻¹ para amêndoas, avelãs, soja, leite ou amendoim.

Segundo Broll [253], esta técnica é a ideal para ser usada no controlo de qualidade no sector industrial devido às suas características específicas, para além de que o *PCR* tem evoluído muito para além da detecção de DNA ou amplificação de fragmentos do mesmo, tendo sido já descritos vários desenvolvimentos do método original.

Slowianek e Majak [257], alertam ainda para o facto de que deve ser levado em consideração o problema da degradação do DNA, durante o processamento tecnológico de alimentos, quando se avaliam técnicas de *PCR* para a detecção de DNA alérgico. Estes autores mencionam ainda Koeppel et al. [257], que investigaram produtos de aveia processados (cereais de pequeno almoço), no que concerne ao seu conteúdo de gliadina de trigo.

De acordo com Besler [256], as técnicas de *PCR* foram bem aceites para a identificação de diferentes espécies (por exemplo, peixe, carne de porco), para a detecção de alimentos geneticamente modificados (por exemplo, milho e soja) assim como a detecção de agentes patogénicos em alimentos (nomeadamente, salmonela, listeria). Aponte-se contudo que apenas alguns estudos utilizaram métodos baseados em *PCR* para a determinação de alergénios alimentares [256].

A tabela 6.1. resume os métodos de detecção de DNA de gliadinas do trigo (inicialmente realizados para a doença celíaca) e a amplificação de um fragmento de DNA do alergénio principal da avelã. Os dois métodos possuem uma elevada sensibilidade (até 0,001%) [256].

Tabela 6.1. – Aplicações do *PCR* para a detecção de DNAC de alergénios alimentares (adaptado de: [256]).

Metodologia	Deteção do alérgico	Reactividade cruzada	Amostras	Limite de detecção
Amplificação por <i>PCR</i>	Avelã (fragmento de 182 pb do <i>Cor a 1</i>)	Não (30 frutas diferentes, nozes, feijões e outros ingredientes testados)	Barras de chocolate, batatas fritas e flocos, muesli e manteiga de amendoim	Avelã: 0,001 g/ 100g
Amplificação por <i>PCR</i>	Prolamina do trigo (<i>ω-gliadina</i>)	Sem reacção à aveia	Amostras de aveia, flocos ou grãos e produtos processados de aveia	Farinha de trigo: 0,001-0,01 g/100g; Gliadina: 0,04-4 mg/100g

O mesmo autor refere ainda que, enquanto cada proteína é um alérgénio potencial, apenas uma pequena percentagem de proteínas são alérgicas. Os métodos envolvendo soro humano específico de IgE podem detectar alérgénios, ao passo que as análises bioquímicas ou biomoleculares só podem detectar uma determinada proteína e não um alérgénio [256].

Existem muitas variantes para esta técnica de *PCR*, com o objectivo de melhorar por exemplo a especificidade de amplificação no caso do “*nested PCR*”, ou a sensibilidade no caso do “*hot start PCR*” ou mesmo economizar tempo através da utilização do “*multiplex PCR*”.

6.1.4. *PCR* em tempo real

Segundo Hirao et al. (*cf.* Kirsch et al. [258]), na abordagem de *PCR* em tempo real, a detecção é isenta de gel, sendo executada em tempo real; a amplificação dos produtos de *PCR* resulta numa fluorescência proporcional à quantidade do gene de interesse na amostra. Existe a possibilidade de realizar a quantificação usando um único padrão interno para compensar a variabilidade na eficiência da extracção e amplificação de DNA [242].

A *PCR* em tempo real foi considerada a mais poderosa ferramenta para análise quantitativa de ácidos nucleicos [259]. Esta técnica é um aperfeiçoamento do método inicial desenvolvido por Mullis [260]. A *PCR* permitiu, por exemplo, manipular DNA para fins de clonagem, engenharia genética e sequenciamento. Mas, como técnica analítica, o método de *PCR* original tinha algumas limitações. Aponte-se que ao amplificar a sequência de DNA para depois analisar o produto, a quantificação é extremamente difícil porque o *PCR* origina essencialmente a mesma quantidade de produto, independentemente da quantidade inicial de moléculas de DNA da amostra que estavam presentes [259]. Esta limitação foi resolvida em 1992 pelo desenvolvimento deste novo método por Higuchi et al. [261]. Aqui a quantidade de produto formado é controlada durante o decurso da reacção, através da monitorização da fluorescência dos corantes ou sondas introduzidas na reacção, que são proporcionais à quantidade de produto formado, e o número de ciclos de amplificação necessários para obter uma determinada quantidade de moléculas de DNA é registado. Assumindo uma certa eficiência de amplificação, que é tipicamente cerca do dobro do número de moléculas por ciclo de amplificação, é possível calcular o número de moléculas de DNA da sequência amplificada que estavam inicialmente presentes na amostra. Com os produtos químicos de detecção altamente eficientes, a instrumentação sensível e os ensaios optimizados que estão disponíveis, hoje em dia, o número de moléculas de DNA de uma determinada sequência numa amostra complexa podem ser determinadas com precisão e sensibilidade sem precedentes, sendo suficientes para inclusivé detectar uma única molécula.

Os usos típicos de *PCR* em tempo real incluem a detecção de agentes patogénicos, a análise de expressão de genes, a análise de polimorfismo de nucleótido único (*SNP*), a análise de aberrações cromossómicas e, mais recentemente, também a detecção de proteínas por *PCR* imune em tempo real [259]. Este método também foi aplicado para a detecção de vestígios de sementes de sésamo em alimentos. O sésamo foi detectado em todas as amostras com teor declarado de sésamo (bolachas, biscoitos de sésamo, “*shortbread*”), com a excepção do óleo de sésamo, no entanto, o sésamo não foi detectado em amostras que poderiam contê-lo ou onde não foi declarado. A determinação não deu reacções cruzadas com 17 componentes alimentares semelhantes [262]. Além disso, com este método foi detectada a presença do gene da desidrogenase do manitol em alimentos. O método foi testado em mais de 50 amostras de alimentos com um limite de detecção de 0,0005-0,001% (w/w) nas amostras-padrão de salsicha [263]. Mustorp et al. [264] apresentaram um método sensível e quantitativo em tempo real usando sondas de *PCR Taq-Man* capazes de detectar adições de 0,01- 0,001% (w/w) de aipo e 0,005% de mostarda e de sésamo em alimentos.

O *PCR* em tempo real apresenta também a vantagem de quantificar de forma precisa e com maior reprodutibilidade os ácidos nucleicos uma vez que determina os valores na fase exponencial da reacção [265].

6.1.5. *PCR-ELISA*

Na abordagem *PCR-ELISA* a detecção de um alérgénio não necessita de electroforese em gel. Segundo Diaz-Amigo e Popping [246], trata-se de um ensaio híbrido que combina o *PCR*, como primeiro passo, e o método *ELISA* como sistema de detecção. Nele, conforme adiantam Slowianek e Majak [255], o fragmento de DNA amplificado é marcado com biotina ou digoxigenina, graças à qual ele pode ser facilmente determinado com o teste de *ELISA*. Esta técnica requer a junção do fragmento de DNA amplificado de um alimento alérgénico a uma proteína específica assinalada com uma sonda de DNA, que é então unido a um anticorpo marcado com uma enzima específica. A quantificação de DNA baseia-se na produção de cor pela reacção entre a enzima e substrato [247].

Nesta combinação é conjugada a alta especificidade da detecção baseada em DNA com a simplicidade e baixo custo de *ELISA*. Holzhauser et al. [264] demonstraram que a *PCR-ELISA* é uma importante ferramenta para a monitorização alérgénica. Com este método eles determinaram alérgénios de avelã em alimentos processados num nível inferior a 0,001% (w/w). A elevada especificidade da *PCR-ELISA* para a avelã e alta estabilidade do DNA fazem com

que este método seja muito útil e conveniente para a monitorização deste alérgénio em produtos alimentares [264].

6.1.6. *MultiplexPCR*

O *Multiplex PCR* permite amplificar vários fragmentos de DNA simultaneamente por aplicação de vários pares de *primers*. Este método foi descrito por Chamberlain et al. [267], sendo utilizado quando se pretende poupar tempo, através da análise de várias amostras em paralelo. No entanto necessita ainda de procedimentos de optimização. Esta técnica tem sido usada em vários ensaios tais como o teste a polimorfismos, mutações ou transcrição reversa da *PCR* [253], assim como para determinar o DNA em simultâneo dos seguintes alérgénios: avelã, amendoim, aipo, soja, ovo, leite, amêndoa e gergelim. O teste exhibe uma elevada especificidade e sensibilidade na gama de 0,01%, embora menor para o ovo e leite, devido ao baixo teor de DNA [268].

6.1.7. Vantagens e desvantagens dos métodos baseados no DNA

As análises com técnicas de *PCR*, tendo em vista a detecção de um grande número de alérgénios, apresentam um alto potencial devido à sua rapidez, eficiência, sensibilidade e simplicidade [268]. Esta técnica é confiável, altamente específica e sensível, com limites de detecção até menos de 10 mg kg⁻¹ em amêndoas, avelãs, soja, leite ou amendoim [257]. Ela permite minimizar as reacções cruzadas e evitar resultados falso-positivos, escolhendo *primers* adequados de diferenciação entre duas sequências de DNA estreitamente relacionadas [256].

Os métodos baseados em DNA apresentam claras vantagens mas também algumas desvantagens, pois não têm como alvo o alérgénio da amostra, ou seja a proteína em si, mas a detecção do DNA que o codifica, o qual nem sempre se correlaciona com a presença do mesmo. Segundo Ismail et al. [247], isso poderá dar origem a conclusões falsas relativamente à presença do alérgénio na amostra, como é o caso de um alimento que tenha sido fortificado com uma proteína purificada, onde a proteína e o DNA podem ser separados. A principal desvantagem, no entanto, é a degradação do DNA durante o processamento de alimentos e a dependência do limite de detecção da quantidade e pureza da matriz [256].

Portanto, a presença da sequência de DNA na amostra de alimento não significa, necessariamente, a presença do alérgénio, mas apenas detecta a origem do produto, partindo de um género característico ou espécie, no caso de contaminação [242].

Portanto, outra grande limitação é o facto de que existe a possibilidade de resultados falsos-negativos e falsos positivos na amostra do alimento em causa [256]. Segundo Van Hengel [271], estes métodos não são recomendados para a detecção de alergénios em produtos alimentares com baixo teor de DNA da proteína (teor proteico elevado), como é o caso dos ovos. Por conseguinte, são uma boa escolha quando o teor de proteína é baixa, por exemplo, no caso do aipo [270]. Apesar disso, Slowianek e Majak consideram que as técnicas são promissoras no campo da detecção, ultrapassando a imunodetecção [259].

A vantagem das técnicas de *PCR* sobre os métodos que se baseiam na detecção de proteínas é a extracção eficiente do DNA em condições desnaturantes, sendo mais eficaz que a extracção da proteína a partir de matrizes alimentares, e a estabilidade do DNA, ao longo das alterações geográficas e sazonais, enquanto que a concentração de proteína nos alimentos depende de muitos factores como o género, espécie ou condições de crescimento [247, 270]. Além disso, de acordo com Monaci et al. [244], o processo de detecção baseado em DNA é menos afectado pelo processamento dos alimentos uma vez que o DNA, devido à sua estabilidade química mais elevada, resiste melhor ao processamento do que as proteínas.

As técnicas de *PCR* contam com uma sequência de DNA simples e bem definida [256]. São métodos rápidos e podem ser configurados mesmo em poucos dias, se a sequência de DNA analisada for conhecida [256].

Os processos de preparação dos alimentos influenciam de forma diferente o DNA, o qual pode ser facilmente degradado durante o processamento, conduzindo a resultados falsos [250]. Köppel et al. [268] conseguiram detectar contaminações abaixo de 0,1% (w/w) com técnicas de *PCR*, enquanto o teste de *ELISA* foi de cerca de 10 vezes menos sensível.

Diaz-Amigo e Popping [246], por seu turno, referem que os ensaios baseados em DNA têm vantagens em relação aos imunoensaios, dado que estes necessitam da identificação e da caracterização das proteínas para poderem produzir anticorpos específicos para os alergénios, as quais nem sempre se encontram disponíveis.

Segundo Kerbach et al. [271], outras das dificuldades destes ensaios são as possíveis interferências através da inibição por iões metálicos ou por proteínas após filtração.

6.2. Métodos de detecção/quantificação de alergénios baseados em proteínas

Segundo Ismail et al. [247] os imunoensaios são técnicas analíticas que envolvem métodos baseados em proteínas, aplicadas na análise de alergénios e que utilizam anticorpos. Diaz-Amigo e Popping [246] referem ainda que nestes ensaios os anticorpos são utilizados como meios de detecção, dado que são capazes de se conectarem especificamente a moléculas

de natureza química heterogénea, ou seja, dada a sua elevada especificidade e sensibilidade. A utilização de anticorpos destina-se à detecção de proteínas alergénicas específicas que servem de identificadores dos alimentos alérgicos [245].

Besler [256] salienta que para ultrapassar as desvantagens associadas à utilização de soro humano com IgE, os imunoensaios utilizam “antisoro” desenvolvido em animais como coelhos, ratos, cabras, ovelhas e mais recentemente, galinhas. Estes anticorpos detectam mais os antígenos usados para imunização do que os próprios alergénios [256].

Tanto os anticorpos monoclonais, como os policlonais permitem a detecção de proteínas. No entanto, os anticorpos policlonais são uma mistura complexa de anticorpos com diferentes especificidades de ligação às moléculas alvo, que se relacionam com as regiões dessas mesmas moléculas. Em contrapartida, acrescenta Diaz-Amigo, os anticorpos monoclonais possuem uma especificidade e afinidade únicas [272]. A conformação da proteína após a extracção dita o grau de afinidade entre os anticorpos e as proteínas. No entanto, a maior parte dos *Kits* de imunoensaios encontrados no mercado usam os chamados anticorpos policlonais, diferindo no número de proteínas que têm como alvo, assim como na especificidade [247].

Estes ensaios são também mais rentáveis em termos económicos do que as outras técnicas, tais como a espectrometria de massa, para além da sua maior sensibilidade e especificidade [272]. Diaz-Amigo [272] adianta ainda que para a realização dos imunoensaios é necessário recorrer a um material de suporte destinado a imobilizar o antígeno ou o anticorpo. A autora refere ainda que a plataforma que mais se utiliza é a placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços, apesar de se poder recorrer às membranas de nitrocelulose ou de fluoreto de polivinilideno (*PVDF*) [272].

Entre os vários métodos que recorrem a imunoensaios para detecção de alergénios alimentares, destacamos os de *ELISA*, usualmente usados para fins quantitativos e que podem ser encontrados em quatro modelos: o método competitivo e dentro dos não competitivos temos o directo, o indirecto e o do formato em “sandwich”. Segundo Ismail et al. [247] o primeiro é utilizado para detectar proteínas de menores dimensões (inferior a 5kDa), sendo que o último é convencionalmente mais usado.

Os imunoensaios também são utilizados como métodos de rastreio, ou seja, para análises qualitativas e semiquantitativas. A sua principal vantagem reside no facto de permitirem analisar um grande número de amostras, dado que se conseguem obter resultados em pouco tempo. A simplicidade destes ensaios, menos propensos a variações experimentais, permite a sua realização em ambientes que não disponham de um rigoroso controlo laboratorial [247].

O *Western Blot* e o *Dot Immunoblotting* são dois desses métodos que são aparentemente idênticos, com a excepção de que no caso do segundo o extracto proteico não é separado por electroforese e é aplicado directamente sobre a membrana de nitrocelulose ou de *PVDF*, antes do anticorpo específico para proteínas que é marcado enzimaticamente [247].

Besler [256] refere a existência de um método de *Dot Immunoblotting* que terá sido descrito para a detecção de proteínas do amendoim em vários produtos. Segundo o autor, as amostras são inseridas num tecido de poliéster pré-revestido com anticorpos contra a proteína de estudo, e as proteínas que se ligarem serão detectadas por um anticorpo secundário. Este método foi descrito como sendo altamente sensível e permite um rastreio de baixo custo de amostras [256]. No entanto, a sua maior desvantagem reside no facto de poder gerar resultados falsos-positivos, devido à ausência de separação proteica, o que pode originar uma reactividade cruzada com outros alergénios ou outros componentes dos alimentos [245].

Para além dos métodos acima referidos, existem o *RAST* e *EAST*, o *ImmunoCAP*, o *SDS-PAGE* e *IEF-PAGE* com *Immunoblotting*, as imunodifusões, as imunoelectroforeses e ainda os Imunoensaios com Biossensores e Ensaaios de Fluxo Lateral, que também serão abordados.

6.2.1. *ELISA*

Entre os métodos imunoquímicos disponíveis, o método mais utilizado em laboratório para detectar alergénios é o de *ELISA*. Este ensaio imunoenzimático destina-se a diagnosticar proteínas alergénicas cujos anticorpos provêm principalmente do soro de um animal imunizado. Este soro contém a imunoglobulina G (IgG), que é capaz de se ligar ao alergénio utilizado para imunizar o animal, ao passo que em testes usados para o diagnóstico clínico são utilizadas as propriedades da IgE presente no soro humano. O extracto do alimento é analisado em poços de microplacas [242].

Segundo Hsieh [273] este método recorre à ligação de um anticorpo ou um antígeno, ambos solúveis, a placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços (suporte sólido), que possuem uma alta capacidade de união, pelo que os anticorpos, antígenos ou haptenos unem-se às paredes de cada poço e os locais de ligação remanescentes são bloqueados para evitar ligações não específicas à placa, o que poderia provocar interferências [272]. Segundo Diaz-Amigo [272], entre os agentes bloqueadores existentes, os mais comuns são a caseína e a albumina de soro de bovino.

Segundo Kirsch et al. [242], o princípio da quantificação baseia-se na medição da actividade enzimática de um segundo anticorpo específico para a proteína (anti-IgG, por

exemplo, um anticorpo anti-humano de coelho), acoplado a uma enzima. Este segundo anticorpo liga-se ao complexo anticorpo primário-alergénio, tal como é desmonstrado na figura 6.2. [242].

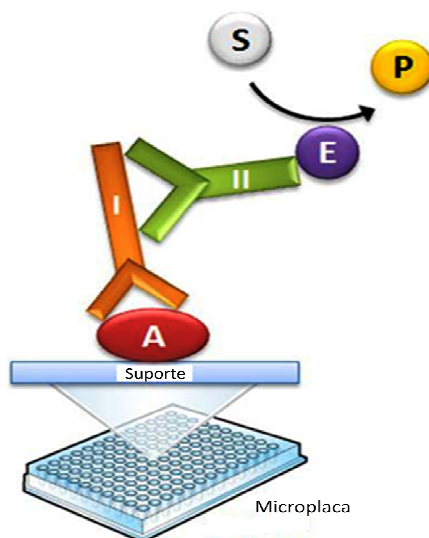


Figura 6.2. – Esquema representativo do teste de *ELISA* em formato de *sandwich* (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para a detecção de um antígeno alvo. A = antígeno alvo; I = anticorpo primário; II = anticorpo secundário; E = enzima ligada ao anticorpo secundário; S = substrato incolor, P = produto colorido (adaptado de: [242]).

A quantificação também pode ser baseada na medição do anticorpo primário possuindo uma enzima ligada, isto em alternativa ao anticorpo secundário, como é o caso do *ELISA* directo. A reacção do substrato com a enzima produz um produto com uma dada cor, para a qual a absorção é proporcional (*ELISA* directo, indirecto ou *sandwich*) ou inversamente proporcional (*ELISA* competitivo) à quantidade de alérgénio presente na amostra. Um imunoensaio de multi-alérgénios produzido a partir do modelo de *ELISA* tem sido desenvolvido e permite a determinação simultânea de pelo menos $1 \mu\text{g g}^{-1}$ (proteína) de cada alérgénio do amendoim e das nozes no chocolate, mas ainda não foi estabelecido um *LOQ*. O *ELISA* foi recentemente combinado coma espectrometria de massa (*MS*) acoplada indutivamente com plasma (*ICP-MS*), para aumentar a sensibilidade e a precisão da detecção de um *ELISA* simples. Nos testes de *ELISA-ICP-MS* o anticorpo secundário é marcado com um isótopo estável, em vez da enzima, podendo ser usado para quantificação com um espectrómetro de massa. Esta técnica permite detectar $2 \mu\text{g}$ de alérgénios de amendoim por grama de matriz à base de cereais [242].

Relativamente aos marcadores enzimáticos usados nos ensaios de *ELISA*, Rout e Ma [252] referem que os mais frequentes são a catalase, a peroxidase, a fosfatase alcalina, a glucose oxidase e a β -galactosidase. Somente na última etapa do processo é que ocorre a reacção

enzimática que permite a detecção, quando a enzima gera um sinal detectável ao converter o substrato sem cor num produto solúvel colorido na solução [252].

Segundo Hsieh [273], a leitura deste produto colorido pode ser efectuada directamente ou com recurso a um espectrofotómetro, sendo que a intensidade da cor desenvolvida determina a quantidade de antígeno alvo presente no extracto da amostra. O mesmo autor adianta ainda que para que este ensaio se possa realizar é necessário que uma enzima seja estável, que se possa ligar rapidamente aos antígenos ou anticorpos e ainda que seja capaz de catalisar rapidamente uma transformação que seja observável através da utilização de um substrato simples [273]. De acordo com Rout e Ma [252], os substratos mais usados no caso da peroxidase são a ortofenilenodiamina (*OPD*) e o ácido *BTSA* (etil 3-benzotiazolina-sulfónico-6) (acoplado com peróxido de hidrogénio), sendo necessário proceder a uma lavagem, no intervalo entre cada etapa, para possibilitar a remoção dos reagentes em excesso [252].

Hsieh [273] refere ainda a existência de cinco etapas comuns no protocolo de todos os ensaios de *ELISA*, apesar dos procedimentos poderem variar de acordo com as variações dos primeiros. Segundo este autor, as amostras dos alimentos podem incluir elementos indesejáveis que podem influenciar a concorrência pelo local de ligação do anticorpo, pelo que é importante que se incluam controlos positivos e negativos nos ensaios. Quando o ensaio está a decorrer de forma correcta o controlo positivo assinala essa situação e o mesmo se passa com o controlo negativo que indica a ausência de contaminações ou reacções não específicas no ensaio [273]. Quanto às etapas acima referidas, na primeira é feito o revestimento do anticorpo ou antígeno numa fase sólida; na segunda bloqueia-se a superfície que não foi revestida na fase sólida com um tampão de bloqueio; na terceira incuba-se com os vários reagentes do imunoensaio; na quarta lava-se a superfície revestida para retirar as moléculas que não se encontram ligadas e, por último, observa-se a cor obtida no ensaio, directamente de forma visual ou com um espectrofotómetro [273]. Os sinais podem ser detectados de forma directa ou indirecta. No ensaio directo, o marcador enzimático está directamente unido ao anticorpo primário, sendo imprescindível o uso de reagentes mais puros para o processo de conjugação da enzima. No segundo caso, usa-se um reagente intermediário para unir o anticorpo primário a um anticorpo secundário conjugado enzimaticamente. Estes ensaios podem ser mais sensíveis que os directos, dado que existem mais moléculas de enzima que podem ser unidas ao anticorpo ou ao antígeno de detecção [273].

Os métodos de realização de *ELISA* são quatro, o competitivo e nos não competitivos consideram-se o directo, o indirecto e o de formato em *sandwich*. Os seus fundamentos são apresentados na figura 6.3.

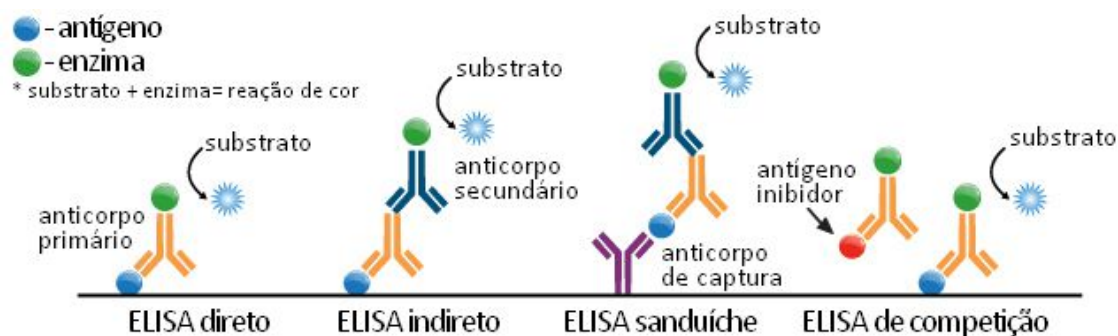


Figura 6.3. – Esquema representativo do fundamento dos quatro modelos do método de *ELISA* (fonte: [274]).

Segundo Besler [256], no método de *ELISA* mais usado – o de *sandwich* – o anticorpo é adsorvido na fase sólida (anticorpo de captura) a fim de se ligar às proteínas da amostra (antígeno). Segue-se a reacção antígeno/anticorpo 1º e a seguir, o anticorpo 2º (marcado) com a enzima, que pode ser produzido em diferentes espécies mas que é específico para o mesmo antígeno, sendo utilizado para a detecção das proteínas capturadas. Quanto mais o antígeno testado estiver unido pelo anticorpo à fase sólida, mais forte será a reacção de cor dependente da enzima. A fim de detectar vestígios de alimentos alergénicos a sensibilidade do *ELISA* pode ser aumentada pelo uso de anticorpos secundários com estanho e estreptavidina conjugada com peroxidase [256].

Foram desenvolvidos vários testes para a detecção e quantificação de extractos de proteína inteira ou de alergénios específicos. A tabela 6.2., que se encontra no Anexo XIV, apresenta uma visão geral dos métodos de *ELISA* desenvolvidos, onde se pode encontrar a quantificação das proteínas da amêndoa, leite de vaca, avelã, amendoim, soja, trigo e dos alergénios de alguns produtos. Existem *kits* de ensaios de *ELISA* disponíveis comercialmente com sensibilidade suficiente para detectar alergénios nos ovos, leite, amendoim e trigo (ω -gliadina) [256].

6.2.2. Western Blot

O *Western Blot* é uma técnica importante usada em biologia celular e molecular. Ao ser utilizado, os investigadores são capazes de identificar as proteínas específicas a partir de uma mistura complexa de proteínas extraídas a partir de células. A técnica é constituída por três fases: 1) a separação por dimensões; 2) a transferência para um suporte sólido; 3) a marcação

das proteínas alvo, utilizando um anticorpo primário e secundário adequado para se visualizar [275].

Segundo Hseih [273], este método combina duas técnicas: a electroforese em gel de poliacrilamida (*PAGE*) numa primeira fase, a qual se utiliza para proceder à separação das proteínas da mistura que as contém, de acordo com a sua massa molecular. Depois realiza-se um imunoensaio que detecta a presença de proteínas antigénicas [273]. Por electroforese entende-se como sendo a migração de moléculas carregadas numa solução através de um campo eléctrico. Segundo Smith [276], o tipo de electroforese que é mais utilizado com proteínas é a electroforese por zona, técnica onde a separação das proteínas de uma mistura se processa pela migração em soluções-tampão através de uma matriz de um polímero sólido – o gel. Os géis de poliacrilamida são os mais indicados, embora também se usem outras matrizes como o amido ou a agarose, adiantando que a separação proteica está directamente relacionada com a fracção das proteínas da matriz e com a sua carga [276].

De acordo com Mahmood e Yang [275], no *Western Blot* a mistura de proteínas é separada com base no peso molecular e por tipo, por meio de electroforese em gel. Estes resultados são, então, transferidos para uma membrana de produção de uma banda para cada proteína. A membrana é então incubada com anticorpos marcados especificamente para a proteína de interesse. O anticorpo não ligado é lavado deixando apenas o anticorpo ligado à proteína. Os anticorpos ligados são então detectados através do desenvolvimento da película colorida. Como os anticorpos apenas se ligam à proteína de interesse, apenas uma banda deve ser visível. A espessura da banda corresponde à quantidade de proteína presente; assim um padrão com peso molecular conhecido pode indicar a quantidade de proteína presente, por comparação da posição relativa das bandas [275].

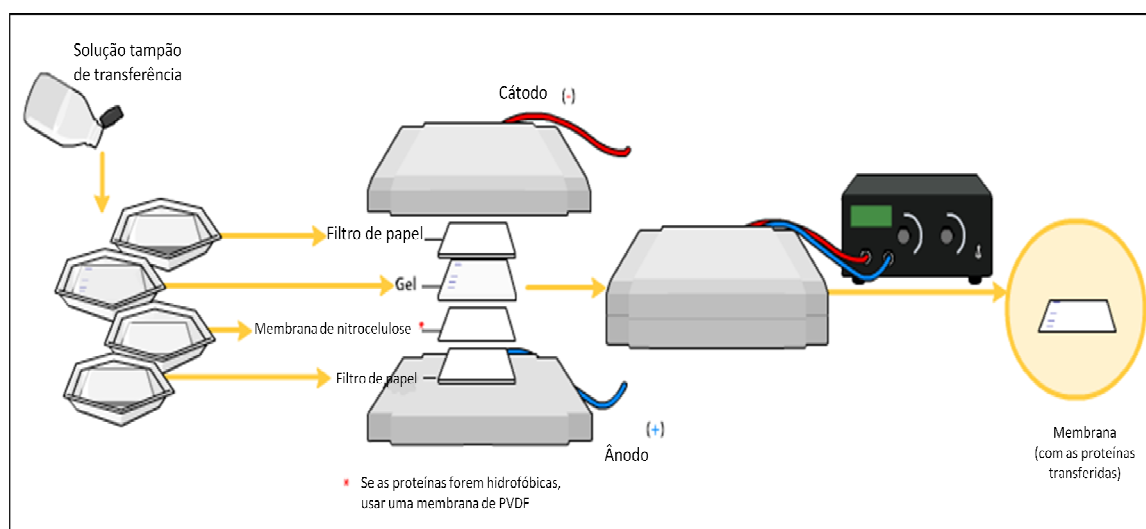


Figura 6.4. – Montagem do *Western Blot* em *sandwich* (adaptado de: [276]).

Segundo Diaz-Amigo [246] as proteínas podem ser separadas na sua forma nativa ou com recurso a condições desnaturantes e redutoras. Se a opção recair na separação mediante electroforese nativa, esta processa-se com base no tamanho, forma e carga das moléculas [276]. No entanto, o segundo procedimento é mais comum e desenrola-se da seguinte forma: as amostras seleccionadas são colocadas à temperatura de ebulição numa solução tampão contendo um agente redutor (como o mercaptoetanol) e um detergente, o dodecilsulfato de sódio (*SDS*). Através deste procedimento as proteínas perdem a sua estrutura terciária e as ligações dissulfureto são quebradas, o que possibilita a separação individual dos polipéptidos ao longo do gel [246].

De acordo com Hseih [273], a amostra é então aplicada ao gel de poliacrilamida, procedendo-se à sua separação por electroforese baseada na sua massa molecular, dado que todas as proteínas se encontram carregadas negativamente e com a mesma forma alongada [273]. Após a separação procede-se à transferência das proteínas para uma membrana, que pode ser de *nylon*, nitrocelulose ou *PDVF* [246]. Esta membrana é então incubada com uma solução da mistura de anticorpo e enzima, removendo-se o excesso através de lavagem. Por último é adicionado o substrato enzimático, formando-se então uma faixa colorida no local da membrana onde a proteína que reagiu (com o anticorpo) foi imobilizada [273].

Este método requer uma técnica muito complexa que só poderá ser levada a cabo por técnicos de laboratório. No entanto apresenta a vantagem de poder detectar proteínas na ordem dos pictogramas e em alimentos processados [273]. Assim, ao permitir a avaliação da presença de alergénios ocultos nos alimentos sujeitos a processamento, pode servir de complemento aos métodos de *ELISA* [246].

A figura 6.4. representa a metodologia do *Western Blot*.

6.2.3. Dot Immunoblotting

Este ensaio é muito semelhante ao *Western Blot*, mas ao contrário do que sucede neste, no *dot blot* a amostra é directamente adsorvida na membrana (nitrocelulose) e analisada por detecção de anticorpos. É um método de *imunoblotting* que não envolve condições de desnaturação e, assim, os epítomos conformacionais podem ser preservados. Contudo, a adsorção à membrana pode provocar o desdobramento da proteína. Como as proteínas não são separadas pelo peso molecular, tal como se verifica no *Western Blot*, é analisada a imunogenicidade da amostra inteira. Se a amostra consiste num isolado proteico, então também poderão ser analisadas proteínas independentes. Contudo, a resolução da membrana de

coloração é o factor limitante para a determinação das proteínas com um peso molecular demasiadamente alto ou baixo [277].

6.2.4. *RAST* e *EAST*

O teste “rádio-alergénio-absorvente” (*RAST*) utiliza anticorpos ligados a radioisótopos para quantificar soro com IgE. O alergénio é adsorvido a uma fase sólida e incubado com uma amostra de soro. Os anticorpos IgE do soro, que são específicos do alergénio em estudo, reagem de forma cruzada com o alergénio imobilizado. O anticorpo secundário, que é conjugado com um radioisótopo, reage com as IgEs e a radioactividade é medida. Os resultados são quantificados através de uma curva padrão [278]. O teste “enzima-alergénio-absorvente” (*EAST*) é similar ao *RAST*, embora no *EAST* os anticorpos de detecção estejam conjugados com enzimas tais como a fosfatase alcalina, onde a actividade enzimática é medida [279].

As vantagens destes testes são o facto das amostras múltiplas poderem ser testadas numa única vez e do paciente não precisar de estar presente durante o teste. Contudo, quando se pretende quantificação surgem problemas na standardização das técnicas, visto que surgem diferenças de qualidade ao nível das fases sólidas e da preparação das amostras, dependendo dos analistas. Além disso os anticorpos IgG podem causar interferências, visto que competem com as IgEs por alergénios semelhantes [278]. Outras grandes vantagens destes imunoensaios *in vitro* são o facto de terem uma boa reprodutibilidade e de não ser necessário parar a medicação anti-histamínica dos pacientes.

6.2.5. *ImmunoCAP*

Este teste é similar ao *RAST* e ao *EAST*, no entanto oferece melhor sensibilidade e foi concebido para sobrepor algumas das desvantagens do *RAST* e do *EAST*. A principal diferença é que utiliza uma fase sólida de três dimensões, o que minimiza as ligações não-específicas através do uso de anticorpos ligantes diferentes da IgE. Para além disso, a preparação do reagente é feita de forma a reduzir a perda dos epítomos conformacionais. Estes ensaios podem ser feitos em 20 minutos [277].

6.2.6. *SDS-PAGE* e *IEF-PAGE* com *Immunoblotting*

A electroforese em gel de poliacrilamida utilizando o detergente *SDS* é usada para determinar a presença/ausência de alergénios ou para determinar uma alteração no padrão electroforético de uma proteína após um tratamento. Alterações no peso molecular, tais como dimerizações, podem acontecer nestes ensaios. Os alergénios e as proteínas que formam agregados, devido às condições do tratamento, podem ficar demasiadamente grandes para os poros do gel e ficarem presos nos poços ou serem lavados. Inversamente, se o tratamento provoca a fragmentação, os fragmentos proteicos mais pequenos que a resolução do gel vão passar através deste rapidamente, perdendo-se através da solução tampão. Também se verificou que certas proteínas, com uma capacidade induzida de reactividade cruzada intramolecular, podem ter aparências de mancha no gel. Esta capacidade pode dificultar a linearização completa debaixo das condições desnaturantes. Assim, mesmo que o alergénio alterado tenha o mesmo peso, este pode avançar através do gel de uma maneira não expectável, causando uma mancha nas bandas. Este método analítico não é dispendioso e os resultados são obtidos em horas, embora o *SDS-PAGE* por si só não determine a capacidade de reacção dos alergénios detectados com a IgE [277].

A electroforese em gel de poliacrilamida também pode ser feita baseando-se no ponto isoeléctrico das proteínas. Neste caso designa-se de *IEF-PAGE* [256].

Segundo Magdeldin et al. [280], a electroforese *2D-PAGE* desenvolve-se em duas dimensões que ocorrem em gel de poliacrilamida. Na primeira dimensão, as proteínas são dissolvidas de acordo com o seu ponto isoeléctrico e separadas por um gradiente de pH. Na fase seguinte, a separação das proteínas sucede pelo seu peso molecular através do uso de *SDS* [280]. Esta técnica apresenta como vantagem a obtenção de bons resultados na separação de proteínas de massa molecular idêntica (diferem nos pontos isoeléctricos devido a pequenas diferenças na sequência de aminoácidos) e quando se trata de amostras complexas. No entanto, trata-se de um ensaio demorado e árduo que tem também limitações para alguns tipos de proteínas, em particular proteínas alcalinas e hidrófobas [281].

Estas duas técnicas são seguidas de um *immunoblotting* em que as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou *PVDF* depois de feita a coloração do gel, o *blotting*. Depois são adicionados os anticorpos específicos de um *RAST* ou de um *EAST* [242].

6.2.7. Imunodifusão

Alguns métodos foram desenvolvidos tendo como base a precipitação específica de um antígeno e anticorpo em géis de agarose, sendo por isso designados de imunodifusão. A difusão simples é uma técnica na qual apenas um dos dois reagentes (normalmente o antígeno) migra no gel, sendo que a difusão dupla envolve a migração de ambos os componentes (anticorpo e antígeno) de forma simultânea, um contra o outro. Forma-se um precipitado na zona do gel onde a concentração de ambos atinge a equivalência, aparecendo uma zona de precipitação limitada para cada antígeno [282].

6.2.7.1. Teste de precipitação em tubo

É um método segundo o qual os sistemas antígeno-anticorpo são analisados ao reagirem num tubo capilar cheio com agar. A solução do anticorpo é misturada com agar quente, solidificando depois no tubo. Quando uma solução de antígeno é adicionada, este reage com o anticorpo, formando uma zona de precipitação. O número de zonas formadas é menor ou igual ao número de sistemas de precipitação independentes (isto é, reacções antígeno-anticorpo) presentes na mistura [283].

A figura 6.5. representa precisamente o esquema de uma reacção deste tipo.

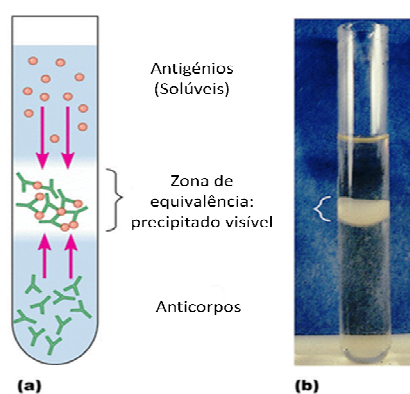


Figura 6.5. – Esquema representativo do teste de imunodifusão de precipitação em tubo; (a) – esquema da reacção; (b) – resultado final da reacção no tubo (adaptado de: [284]).

6.2.7.2. Difusão radial simples

Neste método a agarose, contendo o anticorpo, é vertida numa placa de petri. As soluções de antígeno são colocadas em poços perfurados no gel. Os antígenos difundem-se à volta dos poços e formam um anel de precipitação ou halo, em que a raiz quadrada do diâmetro interior é proporcional às suas concentrações. A quantidade de antígeno contida na amostra desconhecida é determinada por comparação com uma gama de valores de referência. O limiar de sensibilidade é de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ [285].

A figura 6.6. ilustra o método.

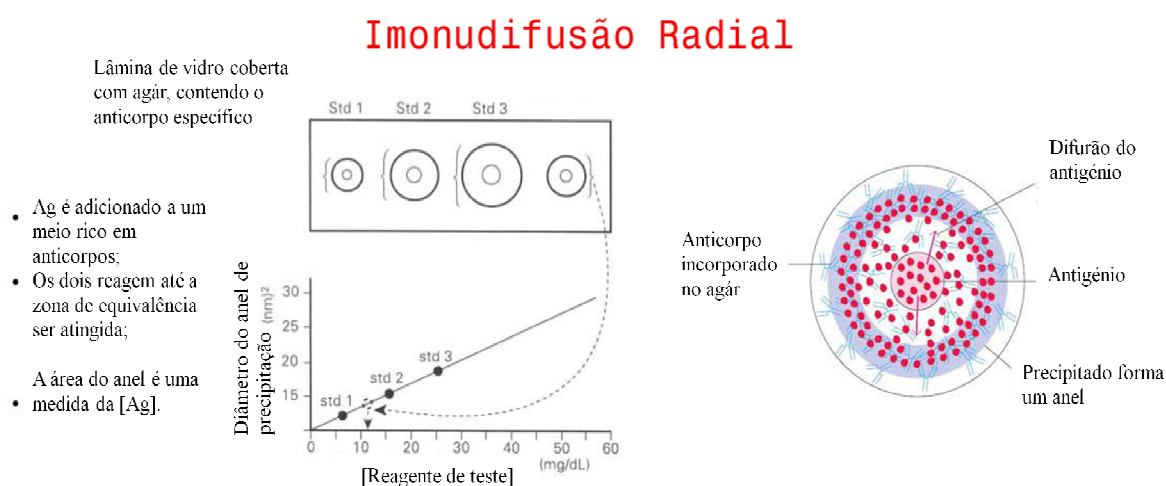


Figura 6.6. – Esquema representativo do método de imunodifusão radial simples (adaptado de: [286]).

6.2.7.3. Difusão dupla

Este método permite que o antígeno e o anticorpo se difundam numa placa de agar que inicialmente não contém nenhum dos reagentes. São colocadas, separadamente, algumas gotas de ambas as soluções em poços no agar. O antígeno e o anticorpo difundem-se um contra o outro a um rácio relacionado com as suas concentrações e os seus coeficientes de difusão. É formada uma linha de precipitação onde o antígeno reage com o anticorpo. As linhas são separadas de forma distinta devido às diferenças dos rácios de difusão. A clara separação das linhas nestas placas torna possível distinguir mais reacções do que no caso do teste em tubo. Consequentemente as placas são mais úteis no estudo destes sistemas dos complexos antígeno-

anticorpo. A linha de precipitação formada por uma reacção individual pode ser identificada se o antígeno ou o anticorpo estiver disponível na sua forma relativamente pura [287].

As suas limitações são o facto de ser apenas um método qualitativo, com pouca sensibilidade e que consome bastante tempo (24-48 horas), embora seja de um fácil procedimento [256].

A figura 6.7. apresenta o procedimento deste método.

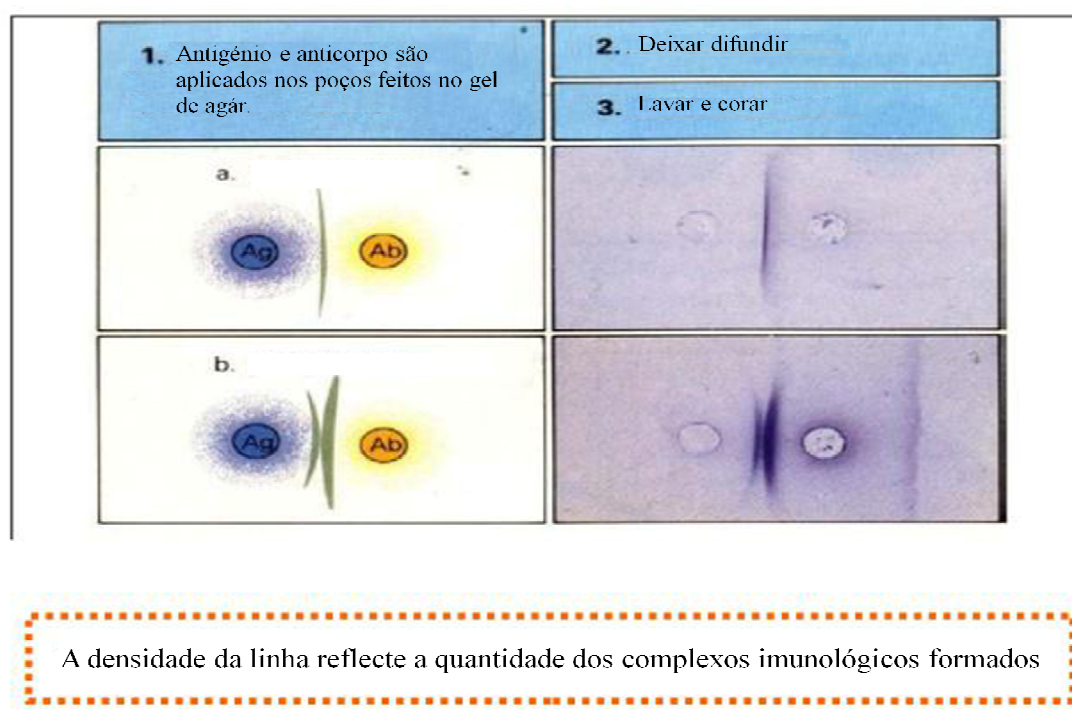


Figura 6.7. – Esquema representativo do procedimento do método de difusão (adaptado de: [286]).

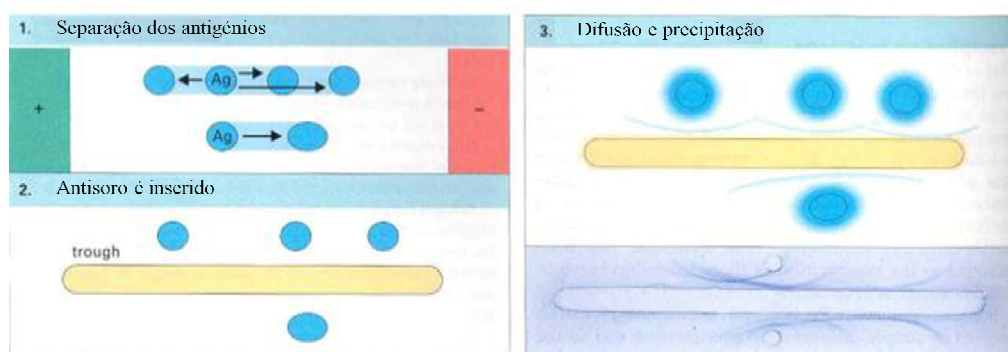
6.2.8. Imunoelectroforeses

As imunoelectroforeses foram criadas para melhorar a resolução e a interpretação do método da difusão dupla.

6.2.8.1. Imunoelectroforese clássica

Esta técnica é executada em dois passos: no primeiro verifica-se a electroforese da mistura de antígenios depositada nos poços do gel, na qual os antígenios são separados em pequenas manchas em função da sua carga. Habitualmente são feitas duas corridas em paralelo no mesmo gel, uma com a amostra e a outra com uma solução padrão para comparação [288], tal como indica a figura 6.8. Depois segue-se uma dupla difusão na qual os anticorpos, colocados num sulco central entre as manchas dos antígenios, migram na direcção dos antígenios. Isto produz uma ou mais linhas de precipitação, dependendo do facto de cada amostra separada for pura ou for constituída por vários antígenios que têm a mesma carga. Este método é sensível, reprodutível e de natureza qualitativa [289].

- Método
 - Ags são separados por electroforese;
 - Anticorpo é inscrito no corte do agár.



- Interpretação
 - Os arcos de precipitação representam os diferentes antígenios;

Figura 6.8. — Esquema representativo do método da imunoelectroforese convencional (adaptado de: [286]).

6.2.8.2. Imunoelectroforese *Rocket*

É uma técnica quantitativa derivada da imunodifusão radial onde se aplica uma corrente eléctrica ao gel. Os anticorpos são bastante distribuídos pelo gel e a amostra de antígeno é colocada num poço, numa das extremidades do gel. À medida que o antígeno migra para o eléctrodo positivo vai-se dispersando e reage com o anticorpo, formando um precipitado. Durante a migração o antígeno liga-se a mais anticorpos, mas como o antígeno vai ficando menos concentrado, difunde-se mais lentamente e a linha do precipitado fica menos distante do centro da migração. Eventualmente todos os antígenos ter-se-ão deslocado e reagido e a forma da zona de reacção assemelha-se a um foguete (*rocket*), tal como indica a figura 6.9. O comprimento ou a área é medida e correlacionada com padrões para quantificação [289].

As suas maiores desvantagens são o facto de os procedimentos serem de difícil execução, nomeadamente a preparação do gel e a imunocoloração [256].

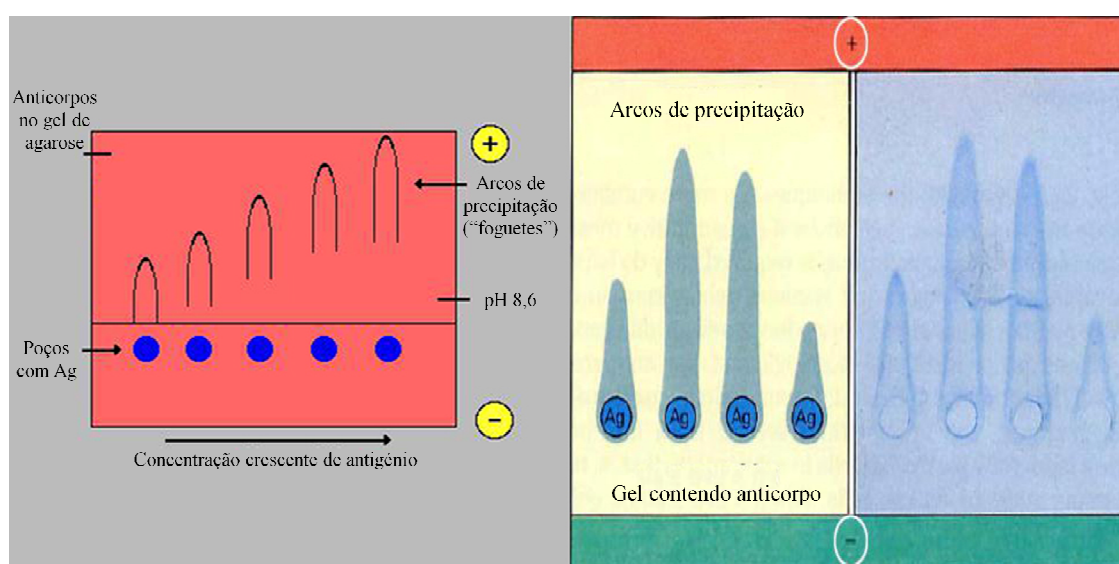


Figura 6.9. – Esquema do método da Imunoelectroforese *Rocket* (adaptado de: [286]).

6.3. Outros ensaios e imunoenaios

Um imunoenensaio é um teste que utiliza complexos imunológicos onde os anticorpos e os antígenos reagem entre si. Os imunoenaios diferem de outro tipo de testes laboratoriais tais como os testes colorimétricos, porque o uso de anticorpos e de antígenos gera um sinal que pode ser medido. Em contraste, a maioria dos ensaios químicos e clínicos de rotina utilizam

reações químicas entre o reagente e a amostra do paciente para gerar um resultado de teste, muitas das vezes não mensurável, apenas qualitativo [273].

6.3.1. Ensaio de fluxo lateral

Embora os métodos de ensaio rápido tenham tido um grande impacto sobre uma variedade de testes de diagnóstico ao longo dos últimos vinte anos, apenas um conjunto deles tiveram tal desenvolvimento que tornou possível a realização de testes fora do laboratório.

Um desses testes, cujo uso se generalizou, é o teste do imunoensaio de fluxo lateral, também conhecido como ensaio imunocromatográfico, dado que se trata de um dispositivo com uma fase móvel que move as amostras ao longo de uma tira de teste [245]. Como muitas das invenções práticas, os imunoensaios de fluxo lateral recorrem à tecnologia inteligente e sofisticada, para a transformar em algo tão simples de operar, que quase qualquer um pode usá-lo. Assim, dado tratar-se de uma técnica de fácil utilização, fiável e portátil e que, entre outras características, também tem a vantagem do baixo custo, aliada à rapidez de resultados, foi fácil adaptá-la para a análise de alérgenos alimentares [273].

Segundo Diaz-Amigo, a aplicação mais usual destes imunoensaios, que possuem carácter qualitativo/semi-quantitativo, é a detecção de contaminações por alérgenos na indústria alimentar, sendo também usados para determinar se a concentração proteica alvo de análise se encontra dentro dos limites especificados [246, 273]. Além disso, são também utilizados para a validação e monitorização da limpeza de equipamentos dessas indústrias [246].

À semelhança do método de *ELISA*, estes ensaios também têm configurações competitivas e não competitivas e até mesmo, segundo Monaci e Visconti [245], um formato de *sandwich*. O primeiro formato é aplicado na detecção de moléculas de pequenas dimensões e o segundo nas moléculas de maiores dimensões. Contudo, estes testes não requerem nenhuma etapa de lavagem para separar as moléculas unidas das moléculas não unidas, contrariamente ao que se verifica nos ensaios de *ELISA* [245].

A execução de um ensaio de fluxo lateral típico requer os seguintes componentes:

- *Sample Pad*, trata-se de uma zona almofadada adsorvente na qual a amostra de teste é aplicada [290].
- Almofada reagente sólida que contém os anticorpos específicos para o analito alvo, conjugados com partículas coloridas (normalmente nanopartículas de ouro coloidais, ou microesferas de látex), que dão a coloração no final do teste [273].

- Membrana de reacção - tipicamente uma membrana de acetato de celulose ou de nitrocelulose sobre a qual os anticorpos anti-analito alvo são imobilizados numa linha que atravessa a membrana para actuar como uma zona de captura ou linha de teste (uma zona de controlo irá também estar presente, contendo anticorpos específicos para o conjugado dos anticorpos primários) [290].

- *Wicking pad* ou reservatório de resíduos - uma almofada mais absorvente destinada a atrair a amostra através da membrana, provocando uma reacção por acção capilar e recolhendo-a [273].

Durante o ensaio, os componentes da tira são normalmente fixados a um material de suporte inerte que pode ser apresentado num formato de vareta simples ou no interior de um invólucro de plástico com uma porta de amostragem e uma janela de reacção para mostrar as zonas de captura e de controlo, tal como indica a figura 6.10. [290].

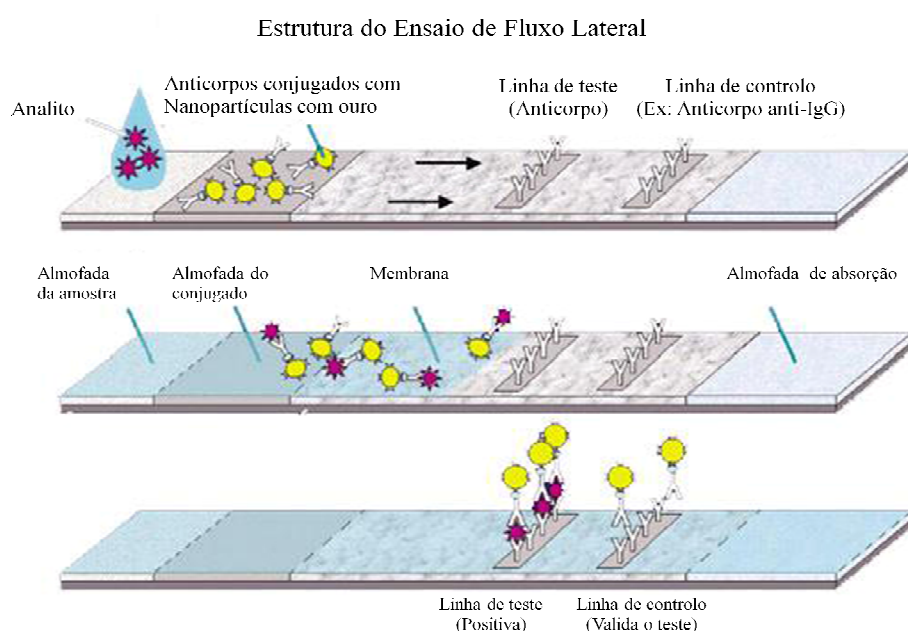


Figura 6.10. - Arquitectura do ensaio de fluxo lateral (adaptado de: [291]).

Segundo O'Farrell [290], para a realização do ensaio não competitivo, coloca-se a amostra de teste na almofada adsorvente (*sample pad*), de onde ela migra até à almofada reagente onde estão imobilizados os anticorpos de detecção conjugados com as partículas coloridas, os quais se encontram numa forma seca [271]. Estando a amostra no estado líquido ao contactar com a mistura seca, esta une-se à mesma, fluindo o conjunto ao longo da tira por acção capilar, até à linha de teste onde se encontra a membrana de reacção. É nesta membrana

que se encontram os anticorpos de captura, imobilizados, com o propósito de apreender o complexo analito-conjugado à medida que o mesmo se move ao longo da tira [290].

Hseih [273] refere ainda que a coloração adquirida pela linha depende do número de complexos aprisionados, pelo que a intensidade da cor está directamente relacionada com a quantidade de antígeno presente na amostra. Para obter um resultado quantitativo, terá que se recorrer a um aparelho que seja capaz de medir intensidade dessa coloração.

Para garantir que o ensaio foi realizado de forma apropriada existe ainda uma linha de controlo, que possui anticorpos secundários capazes de se unirem ao excesso do composto de anticorpo e partículas coloridas que atravessam a linha de teste, sendo que se houver coloração o ensaio está perfeito [273, 290].

O' Farrell [290] adianta ainda que, quando se trata de ensaios de formato competitivo utilizados para testar moléculas de pequenas dimensões com um único epítopo, não é possível unirem-se aos dois anticorpos em simultâneo. Nestes ensaios, a ausência da linha de teste revela que o resultado é positivo.

6.3.2. Imunoensaios com biossensores

Os biossensores são dispositivos que recorrem a reacções bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunosistemas, tecidos ou outros factores, para a detecção de compostos químicos por meio de sinais ópticos, eléctricos ou térmicos [292].

Na análise de alimentos, os biossensores e, em particular, os baseados na ressonância de plasmões de superfície (*SPR*), tornaram-se ferramentas cada vez mais aceites. Segundo Bremer [293], a detecção por *SRP* baseia-se nas alterações do índice de refração na superfície de um chip de sensor, causadas pela união de um analito a um ligante imobilizado. Para a detecção de compostos de elevado peso molecular tais como os alérgenos, os anticorpos específicos são geralmente imobilizados sobre a superfície do chip, tal como é indicado na figura 6.11. [293].

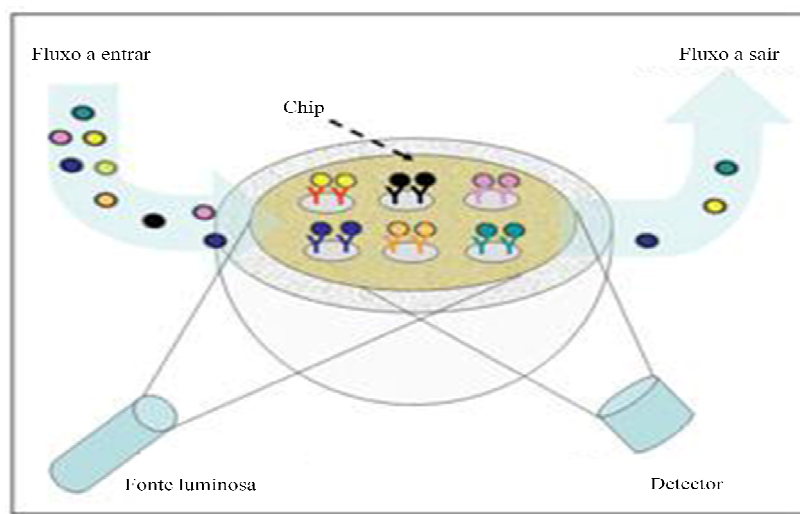


Figura 6.11. - Princípio do imunoensaio de biossensor baseado na ressonância de plasmões de superfície (adaptado de: [292]).

A ligação dos alergénios na amostra é seguida em tempo real e a partir da alteração do sinal a concentração pode ser calculada, partindo de uma curva de calibração [293]. Estes ensaios não requerem marcadores, sendo baseados nas alterações do índice de refração de uma superfície revestida com anticorpos, quando a ligação antígeno-anticorpo se realiza [246]. Além disso, utilizando esta técnica é possível obter resultados tanto qualitativos como quantitativos [246].

Bremer [293] refere ainda que as principais vantagens destes sistemas são o seu tempo de ensaio curto (minutos), o seu alto grau de automação que reduz o tempo de trabalho, a opção de detectar simultaneamente várias substâncias e o facto de efectuarem medições não evasivas, sendo sensíveis e contínuas em tempo real. No entanto, adverte que a sua grande desvantagem é o preço relativamente elevado dos equipamentos necessários. Além disso, apenas pode ser testada uma única amostra de cada vez e requer pessoal de laboratório devidamente treinado.

6.3.3. Detecção/quantificação de alergénios baseada na espectrometria de massa

Actualmente, os métodos baseados em anticorpos são utilizados principalmente para quantificar alergénios; no entanto, estes métodos têm várias desvantagens. Recentemente, as técnicas de espectrometria de massa (*MS*) de diferentes fontes alimentares têm sido caracterizadas utilizando abordagens diferentes de *MS* e alguns péptidos de assinatura específica têm sido publicados. No entanto, a quantificação de alergénios usando a *MS* não é empregue

rotineiramente. Segundo Koeberl et al. [281] existem actualmente técnicas avançadas de *MS* para quantificá-los, incluindo a monitorização de reacções múltiplas. Esta última oferece baixos limites de quantificação para múltiplos alergénios em matrizes simples ou complexas, sendo, no entanto, robusta e reprodutível.

De acordo com Monaci e Visconti [294], a *MS* permite caracterizar a composição natural dos alimentos, nomeadamente as proteínas, pelo que pode ser utilizada para identificar ou quantificar alergénios. Os mesmos autores referem ainda que para além do próprio alergénio, a *MS* também permite identificar marcadores que apontam para a presença de alimentos com essas características.

Estes métodos são extremamente sensíveis e específicos, possibilitando a detecção vestigial de proteínas, tornando a identificação independente da estrutura dos alergénios [295]. Também permite detectar vários alergénios numa única análise, no entanto estes ensaios são dispendiosos em comparação com outras técnicas e necessitam de pessoal treinado para serem realizados [243].

Dass [296] aponta ainda outras vantagens como o facto de poder ser aplicada a todos os elementos e a todos os tipos de amostras, sejam elas líquidas, sólidas ou gasosas, assim como voláteis ou não voláteis, polares ou não. Este método também pode ser combinado com dispositivos de separação de alta resolução.

São utilizados diferentes sistemas na proteómica. Um espectrómetro de massa é constituído por três partes distintas: fonte de iões, um analisador de massa e detectores. Como fonte de iões são vulgarmente utilizados os lasers de dessorção/ionização de matriz assistida (*MALDI*) ou de ionização por electrospray (*ESI*). Para analisador de massa são usados o *time-of-flight* (*TOF*) e o *ion trap* (*IT*). Através da combinação de diferentes fontes de iões e analisadores de massa criaram-se sistemas de *MS* híbridos como o *ESI-QToF* (*QToF*), o *ESI-IT* (*IT*) ou o *MALDI-TOF* (*MALDI*). Estes sistemas híbridos podem ser utilizados para identificar proteínas e péptidos. O *QToF* quantitativo e os sistemas *IT* têm a vantagem de identificação e quantificação através das configurações de fragmentação na célula de colisão de *MS* [281].

Segundo Dass [296], nas técnicas de espectrometria de massa são utilizados iões nas medições, pois contrariamente às espécies neutras, é fácil controlar o movimento e a direcção dos iões, assim como a sua detecção. A *MS* consiste em formar iões e separá-los, tendo como base as diferenças existentes na razão massa/carga e na detecção do número de iões para cada valor desta razão [297]. Segundo Smith e Thakur [298], as etapas de ionização e de separação decorrem sob condições de vácuo elevado para que seja possível movimentar os iões livremente no espaço sem que estes colidam ou interajam com outras espécies, pois se isso acontecer os resultados finais poderão ser influenciados. O resultado obtido revela-se como um espectro de

massa que é analisado a fim de se obter o peso molecular, assim como a informação estrutural [298].

Monaci e Visconti [294] salientam que pode ser ainda necessário proceder-se à separação proteica (purificação) antes de se iniciar a ionização. Para esta operação, os métodos que habitualmente são usados são a electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (*2D-PAGE*), a electroforese capilar (*CE*) e a cromatografia líquida (*LC*).

A electroforese capilar é um método que só recentemente foi introduzido para análise de proteínas. Aqui as proteínas são separadas dentro de um tubo capilar de diâmetro curto, cuja operação ocorre num campo eléctrico e tem como base a carga ou a dimensão das proteínas [276], sendo que dois fenómenos electrocinéticos - a electroforese e a electro-osmose – estão na base desta separação [299]. Por electroforese entende-se a migração de iões sob influência de um campo eléctrico [300].

Por outro lado a electro-osmose corresponde ao movimento de um líquido no interior de um tubo capilar através da aplicação de um campo eléctrico, o qual produz um fluxo electro-osmótico [299]. Este método é mais económico do que a electroforese convencional e cromatografia, além de que é rápido e utiliza poucas amostras e poucos reagentes [300].

Em suma, os sistemas de *MS* têm sido desenvolvidos nos últimos anos para análise de alergénios alimentares. As suas técnicas superam as principais desvantagens dos métodos estabelecidos, tais como a reacção não-específica do anticorpo-alergénio e as modificações desconhecidas (reactividades cruzadas). Além disso, os sistemas de *MS* tornam possível gerar informações sobre as sequências de aminoácidos dos alergénios, bem como sobre a identificação e as isoformas das modificações pós-translacionais (*PTMs*) [281].

7. Digestibilidades

As digestibilidades dos alergénios alimentares e das proteínas não alérgicas e a sua comparação são cruciais, uma vez que a estabilidade proteica face à digestão é usada como critério de avaliação do potencial alergénico de novas proteínas [210].

A Biotecnologia tem permitido introduzir no mercado um número crescente de alimentos geneticamente modificados, contendo proteínas de origem não alimentar. Actualmente tem-se tentado validar alguns métodos para testar o seu potencial alérgico, no entanto é difícil prever ou medir a alergenicidade destas moléculas. A solução encontrada pela indústria biotecnológica foi a de avaliar se estas proteínas possuem propriedades similares às que são conhecidas como alergénios, como por exemplo a comparação de sequências de aminoácidos e outras características físico-químicas [301].

Entre estas propriedades encontra-se a estabilidade à digestão no trato gastrointestinal humano [302, 303]. Para além disso, alguns destes compostos demonstraram ser estáveis em condições que simulavam a digestão gastrointestinal humana [212, 304]. Assim, esta estabilidade passou a ser mencionada como uma das propriedades partilhadas pelos alergénios alimentares [305, 306].

Contudo, a estabilidade digestiva da maioria das proteínas alérgicas ainda não foi determinada, nem tão pouco a estabilidade relativa entre estas e as proteínas não alérgicas [307]. Porém, estes dados são fundamentais para validar o uso desta característica como uma ferramenta de previsão na avaliação da alergenicidade proteica.

Existem alguns estudos efectuados neste sentido. Astwood et al. [236] mediu e comparou a estabilidade digestiva de um grupo de alergénios alimentares (na maioria proteínas de armazenamento) e de um outro de proteínas não alérgicas (enzimas) num fluido gástrico de simulação padronizado (*SGF*). Enquanto alguns alergénios se revelaram estáveis no *SGF* durante os 60 minutos da reacção, outros degradaram-se em 30 segundos. Todas as enzimas testadas foram degradadas em 15 segundos, sem formarem quaisquer fragmentos peptídicos estáveis. Perante estes resultados, os autores concluíram que os alergénios eram mais estáveis que as enzimas e propuseram que a estabilidade poderia ser um parâmetro para distinguir alergénios de proteínas não alérgicas.

Alguns grupos de proteínas, como as de armazenamento ou estruturais, são inerentemente mais estáveis à proteólise celular do que outros, como as enzimas. Ainda não é claro que a maior estabilidade dos alergénios observados por Astwood et al. se tenha devido a este

diferencial de estabilidade. Torna-se então pertinente comparar taxas de digestibilidade de proteínas alérgicas e não alérgicas, que tenham funções celulares semelhantes [210].

A alergenidade relativa de um alergénio é habitualmente medida pela percentagem de indivíduos, com alergia a certos alimentos, que exibem a IgE para esse alergénio específico. Os alergénios alimentares são normalmente agrupados em alergénios maiores e menores. Os principais alergénios são proteínas que, para mais de 50% dos pacientes alérgicos estudados, têm ligação específica com a IgE [210].

Fuchs e Astwood [306] classificaram um grupo seleccionado de alergénios do ovo, leite e da soja, de acordo com a sua percentagem de alergenidade, compararam a sua digestibilidade em *SGF* e demonstraram que existia uma correlação entre a estabilidade digestiva desses alergénios e a sua percentagem de alergenidade. No entanto, não ficou claro se essa correlação se manteria, se a digestibilidade de outros alergénios fosse comparada.

Num estudo efectuado para comparar a estabilidade digestiva de alergénios alimentares com a de proteínas não-alérgicas, Fu et al. [210] determinaram se os alergénios possuíam uma estabilidade maior do que as proteínas não-alérgicas de funções celulares semelhantes, num *SGF* e num fluido intestinal de simulação (*SIF*) e se havia uma correlação entre a digestibilidade da proteína e a sua alergenidade (por comparação da digestibilidade com a variação percentual da alergenidade). Os ensaios foram feitos por *SDS-PAGE*.

Entre as conclusões apresentadas, os autores referiram que os seus dados não indicaram que os alergénios alimentares eram mais estáveis à digestão *in vitro* que as proteínas com alergenidade não comprovada. Uma comparação entre a digestibilidade das proteínas dentro dos quatro grupos funcionais definidos nesse estudo (proteínas de armazenamento, lectinas, proteínas contrácteis e enzimas) mostrou que os alergénios poderiam ser mais, igualmente, ou menos susceptíveis à digestão em *SGF* e *SIF* do que as proteínas não-alérgicas de funções celulares semelhantes. No entanto, parece haver alguma semelhança na digestibilidade (em *SGF* e *SIF*) entre os membros de certas famílias de proteínas com funções/sequências relacionadas, independentemente da sua alergenidade [210].

No seu estudo, Fuchs e Astwood [306] indicaram que os alergénios com uma baixa estabilidade no *SGF* tendiam a ter uma certa estabilidade no *SIF*. O estudo de Fu et al. [210], no entanto, demonstrou que esta não é uma característica única dos alergénios alimentares. Além disso, os alergénios que foram rapidamente degradados em *SGF* não eram necessariamente resistentes à digestão em *SIF*, e os alergénios que eram estáveis em *SGF* não eram necessariamente degradados rapidamente em *SIF* [211].

Segundo Moreno [308], é essencial conhecer melhor o processo de digestão ao nível molecular para que o papel da estabilidade da proteína na determinação do potencial alérgico

possa ser entendido. Como resultado, na última década têm sido desenvolvidos vários modelos *in vitro* com o objectivo de avaliar a estabilidade digestiva de potenciais alergénios.

7.1. Modelos de digestão com pepsina

A resistência das proteínas à digestão com pepsina foi proposta como um indicador do potencial alergénico, dado que parece ser uma característica partilhada por muitos alergénios [309, 310]. Assim, esta resistência, utilizando o fluido gástrico simulado (*FGS* ou *SGF*) [311], foi incluída como um dos critérios relevantes para a avaliação da alergenicidade de novas proteínas [312]. De facto, todas as proteínas alergénicas testadas no estudo realizado por Astwood et al. [236], ou eram resistentes à pepsina em *SGF* ou deram fragmentos estáveis, enquanto que as não-alergénicas foram digeridas em 15 segundos.

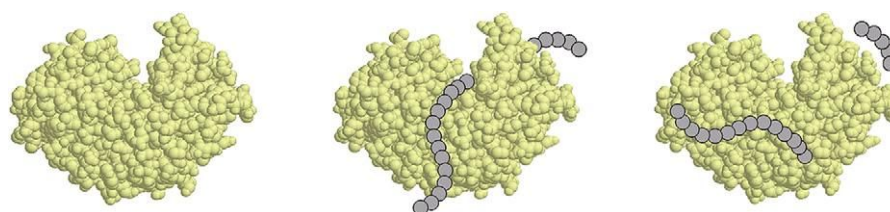


Figura 7.1. - Digestão fisiológica gástrica de proteínas pela pepsina. Após a activação da pepsina, a fenda de ligação ao substrato fica acessível às proteínas, dando lugar à clivagem em peptídeos (adaptado de: [25]).

No entanto, estudos mais recentes têm lançado dúvidas sobre a adequação do uso da resistência à pepsina para prever a alergenicidade, visto que não suportam a ideia de que os alergénios alimentares são necessariamente mais resistentes à digestão do que as proteínas não-alérgicas [313, 314]. As tabelas 7.1., 7.2. (Anexo XII e XIII) e 7.3. resumem os dados da digestibilidade pela pepsina de uma ampla variedade de alergénios alimentares.

7.1.1. Alergénios alimentares que sensibilizam através do trato gastrointestinal

A grande maioria dos alergénios vegetais que supostamente sensibilizam pela via do *GIT*, pertencem às prolaminas ou à superfamília das cupinas. Os seus compostos são geralmente resistentes à degradação por proteases, devido à sua estabilidade estrutural [316]. A estrutura

compacta das prolaminas que incluem as albuminas 2S, as *nsLTPs*, os inibidores da α -amilase/proteases e as prolaminas dos cereais [151], é atribuída à presença de um esqueleto conservado de resíduos de cisteína que formam geralmente quatro ligações de dissulfureto [317, 317].

Como demonstrado na tabela 7.1. (Anexo XII), as albuminas 2S de diferentes espécies tais como a mostarda, sementes de bagaço, castanhas do Brasil, sementes de girassol e de sésamo, demonstraram ser muito resistentes à digestão com pepsina. Da mesma forma, as *nsLTPs* do pêssago, cevada, trigo, cenoura e cereja, entre outros, também revelaram ser resistentes às proteases [318, 144].

Há também proteínas sensíveis à pepsina que podem sensibilizar através do *GIT*, como é o caso da tropomiosina do camarão ou da caseína, α -lactoalbumina e da *BSA* do leite, tal como é indicado na tabela 7.2. (Anexo XIII). Uma possível explicação poderá ser o facto dos fragmentos proteolíticos estáveis, gerados durante a digestão, terem o potencial para se ligarem à IgE e desempenharem um papel na sensibilização [308].

A relativa abundância dos alergénios nos alimentos é um factor que deve ser considerado, juntamente com a sua estabilidade estrutural, já que a abundância pode influenciar a dose de alergénio que sobrevive à digestão gastrointestinal [319].

Assim, os principais alergénios encontrados nos alimentos que incluem uma grande parte da dieta humana tais como o leite, ovos, peixe ou batatas, são todos muito abundantes, correspondendo a 20-60% da proteína no alimento original [308].

A ovalbumina é a proteína predominante na clara de ovo, correspondendo a 54% da fracção da proteína [319], enquanto a patatina representa 40% do total de proteína solúvel da batata [321]. Para além da sua abundância, a β -lactoglobulina, uma lipocalina que possui uma bolsa de ligação lipídica, também é altamente resistente à proteólise. A sua capacidade de ligação ao ião ligante pode ter a aptidão de reduzir a mobilidade do polipéptido, aumentando tanto a estabilidade térmica como a resistência à proteólise [322, 207].

Adicionalmente, algumas proteínas que são muito estáveis à digestão com pepsina não foram mencionadas como alergénios, tais como a zeína do milho ou a concanavalina [210, 323]. Isso enfatiza que, além da estabilidade digestiva, as proteínas devem ter a capacidade de estimular o sistema imunológico de modo a sensibilizar os indivíduos e/ou desencadear uma reacção alérgica.

Assim, embora a avaliação da resistência à digestão gastrointestinal, de proteínas com a capacidade de sensibilizar indivíduos, possa fornecer informação valiosa sobre o seu potencial alérgico, não existe um único critério que possa ser utilizado para prever o potencial alérgico das proteínas alimentares, para os humanos. Os dados da resistência proteica à

digestão devem ser interpretados em conjunto com outros factores, como a triagem de soro específico ou a homologia de sequências de alergénios conhecidos [324].

7.1.2. Alergénios alimentares não sensibilizantes

Existe um outro grupo de alergénios denominados incompletos ou indutores não-sensibilizantes capazes de induzir uma reacção alérgica, mas não uma sensibilização alérgica [325]. Estes alergénios são facilmente degradados durante a digestão gastrointestinal e, como resultado, não podem sensibilizar directamente. Estão indicados na tabela 7.3. Assim, o teste de digestibilidade da pepsina não é uma ferramenta eficaz para avaliar a alergenicidade potencial deste tipo de alergénios.

Os alergénios alimentares de reacção cruzada causadores da síndrome do látex-fruto/vegetal ou do pólen-fruto/vegetal são exemplos típicos de indutores não-sensibilizantes. Os pacientes com estas alergias geralmente sofrem sintomas leves e sobretudo limitados à cavidade oral, a chamada síndrome da alergia oral (OAS) [326]. Estes pacientes sofrem diferentes processos de sensibilização e indução, visto que a sensibilização nestas síndromes parece ocorrer por inalação e não através do GIT.

Tabela 7.3. – Digestibilidade/estabilidade proteica em fluido gástrico simulado (FGS/SGF), de alergénios alimentares vegetais não-sensibilizantes (adaptado de: [308]).

Fonte	Alergénio	Família proteica	Estabilidade do alergénio em SGF (min)	Rácio pepsina/alergénio	pH
Maça	<i>rMal d 1</i>	Homóloga da <i>Bet v 1</i>	0,5	19 (w:w)	2,0
		Homóloga da <i>Bet v 1</i>	0	0,2 (rácio molar)	1,0
Aipo	<i>rApi g 1</i>	Homóloga da <i>Bet v 1</i>	0	0,2 (rácio molar)	1,0
Cereja	<i>rPruav 1</i>	Homóloga da <i>Bet v 1</i>	30	≥60 U/mg de alergénio (a)	2,5
Avelã	<i>rCor a 1.04</i>	Homóloga da <i>Bet v 1</i>	0	0,2 (rácio molar)	1,0
Cereja	<i>rPruav 4</i>	Profilinas	1	≥60 U/mg de alergénio (a)	2,5
Melão	<i>Cuc m 2</i>	Profilinas	0	19 (w:w)	1,2
Abacate	<i>Pers a 1</i>	Classe I-Quitinases	0	20 (w:w)	1,2

a) Pepsina imobilizada em agarose.

Os alergénios de frutas como o abacate (*Pers a 1*), a castanha (*Cas s 5*) ou a banana (*Mus xp Quitinase*) pertencem à classe I das quitinases (família 3 das PRs) e estão envolvidos em reacções cruzadas com o alergénio do látex, o *Hevein* (*Hev b 6.02*) [327, 328]. Yagami et al. [329] descobriram que quase todas as proteínas testadas de reacção cruzada da IgE com o látex-fruto/vegetal (abacate, kiwi, banana, melão e pêsego) foram digeridas pela pepsina em 8 min utilizando soro alérgico de pacientes alérgicos ao látex, o que demonstra que a estabilidade à digestão não é um requisito para desencadear uma reacção alérgica neste tipo de alergénios.

Outra família proteica conhecida por desencadear reacções cruzadas com os alergénios do pólen é a das profilinas [315, 150]. Frutas como a cereja (*Pruav 4*), a pêra (*Pyr c 4*) e o aipo (*Api g 4*) reagem com a profilina *Bet v 2* do pólen de bétula [330] e podem causar sintomas alérgicos em doentes sensíveis ao pólen. Jankiewicz et al. [331] demonstraram que a digestão simulada, péptica e pancreática, de um extracto de aipo reduziu a reactividade à IgE, para o caso de soros específicos contendo a profilina *Api g 4*, entre outros alergénios.

7.2. Parâmetros que afectam a pepsinólise

Segundo Moreno [308], existe uma certa controvérsia sobre a validação da resistência à pepsina como um teste útil para avaliar a potencial alergenicidade de proteínas, isto porque a aparente estabilidade de uma proteína pode estar dependente das condições experimentais empregues (pH, rácio da pepsina para a proteína, pureza da pepsina e métodos de detecção). Com efeito, a susceptibilidade à digestão com pepsina, por parte do mesmo alergénio, poderá variar substancialmente, quando diferentes estudos *in vitro* são comparados.

7.2.1. pH

Dependendo em certa medida do substrato, a activação óptima da pepsina acontece numa gama de pH relativamente larga entre 1,2 e 3,5 [332, 333]. No entanto, num estudo realizado com alergénios do bacalhau, todas as proteínas foram degradados em pequenos fragmentos em 1 minuto e perderam a sua capacidade de ligação à IgE quando a digestão foi realizada em condições fisiológicas (\leq pH 2,5); mas uma pequena alteração do pH de 2,5 para 2,75 dificultou a digestão em vários alergénios, incluindo o alergénio principal do peixe, a parvalbumina *Gad c 1* [334].

A correlação entre a ingestão de drogas anti-ulcerónicas e a indução de uma AA, mediada por IgE, foi recentemente descrita em ratos e humanos, sugerindo que situações em que o pH do

estômago seja elevado, prejudicam a digestão péptica, protegem as proteínas lábeis na digestão e induzem a sua capacidade de sensibilização [335, 336, 337].

O efeito tampão dos alimentos também pode influenciar o pH do estômago de adultos saudáveis. Embora seja normal, após a ingestão de uma refeição, que o pH baixe até 2-2,5 [338], pode aumentar até valores de 3 [339]. Além disso, o pH do estômago pode ser reduzido até 1,5 quando o indivíduo faz jejum e a cavidade fica vazia [340].

7.2.2. Rácio da pepsina/proteína

Segundo Mills et al. [341], o rácio entre a pepsina e a proteína afecta fortemente a susceptibilidade dos alergénios à proteólise. Desse modo, diversos autores demonstraram que, dependendo do rácio de pepsina utilizado, o mesmo alergénio pode ser estável ou degradado pela pepsina [210, 342, 343]. Os protocolos de digestão com pepsina normalmente usam rácios de pepsina:substrato que podem ser considerados muito superiores aos mais prováveis de serem encontrados no estômago. Estimou-se que a secreção de pepsina em adultos situa-se entre 20 a 30 kUnidades de actividade enzimática/24h a 37°C [344] e a partir da actividade da pepsina, em preparações utilizadas em ensaios de digestão, esta pode ser estimada como equivalente a ± 10 mg de pepsina/24 h. Contudo, a ingestão de proteína na dieta de um adulto pode ser estimada em cerca de 75 g/24 h [341]. Estas estimativas indicam que a proteína normalmente iria exceder a pepsina e, por conseguinte, os rácios usados nos ensaios *in vitro* serão superiores aos dos rácios *in vivo*. Além disso, a quantidade de pepsina utilizada nestes estudos deve ser baseada na actividade enzimática e não no peso, de modo a proporcionar uma medida mais consistente da pepsina. Infelizmente, muitos dos estudos publicados não indicam a actividade de pepsina, o que torna mais difícil a comparação entre os protocolos de digestão [308].

Segundo Untersmayr e Jensen-Jarolim [25], os ensaios de digestão com fluido gástrico simulado foram introduzidos para a caracterização de proteínas alimentares, imitando o efeito da proteólise de compostos alimentares no estômago, *in vitro*. Através desses testes, as proteínas podem ser classificadas como resistentes à digestão, as da classe I (verdadeiros alergénios que desencadeiam a sensibilização oral directa), ou como alergénios degradáveis, as da classe II (indutores não sensibilizantes). Assim, os resultados destes ensaios espelham situações de proteólise gástrica completa.

Durante a vida, os indivíduos podem sofrer de alterações fisiológicas no meio gástrico, seja num idade muito precoce ou muito avançada, ou como resultado de patologias gastrointestinais. Além disso, os medicamentos de supressão de ácidos são frequentemente usados para o tratamento de distúrbios de dispepsia. Ao aumentar o pH gástrico, eles interferem

substancialmente com a função digestiva do estômago, levando à persistência de proteínas degradáveis durante o trânsito gástrico. Estes autores referem ainda que a medicação para a úlcera gástrica aumenta o risco de indução de uma alergia alimentar [25].

A tabela 7.4. apresenta os mecanismos de acção de alguns destes fármacos de supressão do excesso de acidez no estômago.

Tabela 7.4. – Mecanismos de acção dos fármacos utilizados na medicação de supressão de ácidos no estômago (adaptado de: [25]).

Substância activa	Mecanismo de supressão gástrica ácida
Antiácidos	Bases ligeiras que neutralizam o ácido gástrico.
Sucralfato	Composto de alumínio que adquire uma forte carga negativa com a sua libertação, ligando-se a cargas positivas no seu ambiente.
Bloqueador dos receptores <i>H2</i>	Antagonista para o efeito estimulante da histamina, através do seu receptor <i>H2</i> na superfície basolateral das células parietais.
Bloqueador <i>PPI</i> (Potent Pump Irreversible)	Bloqueador potente e irreversível da função de bomba de ácido das células parietais (H^+ , K^+ , ATPase).

Por outro lado a digestão gástrica diminui substancialmente o potencial de ligação das proteínas à IgE, o que aumenta a dose limiar de alergénios necessária para despoletar sintomas nos pacientes. Assim, os agentes “anti-úlceras gástrica” que impedem a digestão proteica têm um grande efeito sobre a fase de sensibilização e efectora da alergia [25].

No seu estudo levado a cabo para definir o papel da digestibilidade proteica e dos antiácidos nas AAs, Untersmayr e Jensen-Jarolim [25] concluíram que a capacidade das proteínas para manterem a estabilidade à digestão gastrointestinal estruturalmente intacta aumenta o seu potencial para serem um alergénio e que a sua classificação, usando essa estabilidade como um critério, não fornece informação suficiente face às questões da segurança.

No entanto, este estudo permitiu confirmar que a medicação para o tratamento de úlceras gástricas, ao interferir no processo digestivo gastrointestinal, representa um factor de risco, fazendo também com que diminua a dose limite de alergénios necessária para despoletar sintomas em indivíduos sensibilizados [25].

7.3. Efeitos da matriz alimentar e interacções com outros ingredientes

O estado de hidratação da proteína, os inibidores de proteases e outros efeitos da matriz poderão contribuir para a sua capacidade de chegar aos locais de resposta imune activa, isto na mucosa gastrointestinal [345].

Grimshaw et al. [346] demonstraram que a a matriz alimentar tem um impacto crítico na disponibilidade dos alergénios. Neste estudo, três sujeitos alérgicos ao amendoim consumiram grandes doses do alergénio através de um veículo com um teor elevado de gordura, em testes do tipo *DBPCFC*, e não revelaram os primeiros sintomas orais antes da manifestação dos sintomas mais severos. Isto deveu-se ao facto dos epítomos dos alergénios estarem escondidos pela matéria gordurosa da matriz, sendo apenas detectados depois da digestão da gordura. Isto significa que os alergénios, neste tipo de matrizes, são libertados e absorvidos mais lentamente do que o seriam numa matriz com um baixo teor de gordura. Além disso, também observaram que a gordura inibiu significativamente a detecção *in vitro* de alergénios.

A susceptibilidade de alguns alergénios à proteólise pode ser alterada como resultado do processamento e das interacções entre os alergénios e outros ingredientes alimentares, nomeadamente os lípidos ou polissacarídeos. A susceptibilidade da β -lactoglobulina à proteólise da tripsina e quimotripsina é retardada por pectinas, goma arábica e xilano devido às interacções não-específicas existentes entre as espécies nas misturas de proteína/polissacarídeo [347]. Uma redução da digestibilidade gastrointestinal *in vitro* de um isolado proteico de amendoim também foi observada, na presença de goma arábica e xilano [349]. As interacções não-específicas entre o isolado proteico e os polissacarídeos influenciaram a natureza dos péptidos libertados e produziu uma redução dos anticorpos de ligação [349].

A capacidade das proteínas se associarem às membranas celulares e a outros tipos de estruturas lipídicas tem sido mencionada como uma propriedade que pode ter um papel importante na alergenidade das proteínas [205]. Tais associações podem ocorrer naturalmente no alimento, devido ao processamento ou no GIT devido ao processo digestivo [315].

7.4. Modelos de digestão multifásicos

Devido à variedade de factores fisiológicos e de componentes estruturais alimentares que podem fornecer protecção às proteínas no ambiente digestivo, a avaliação da estabilidade digestiva dos alergénios deve envolver a simulação do ambiente do sistema digestivo humano [308].

7.4.1. Modelos estáticos

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos novos modelos de digestão gastrointestinal *in vitro*, incorporando a natureza multifásica da digestão, para imitar a passagem do alimento através do estômago (fase 1) e depois pelo intestino (fase 2), para avaliar a digestibilidade de alergénios [347]. O desenvolvimento de alguns destes modelos forneceu informação útil, demonstrando a importância do uso de um sistema de digestão *in vitro* relevante fisiologicamente. Assim, Moreno et al. mostraram que a digestão gástrica da α -lactoalbumina foi muito retardada pelas interações com a fosfatidilcolina (secretada activamente pela mucosa gástrica) [350].

7.4.2. Modelos dinâmicos

Os modelos estáticos multifásicos, apesar de importantes, não consideram vários factores tais como o trânsito gastrointestinal ou a mistura apropriada em cada fase da digestão (peristáltese). A tabela 7.5. resume vários parâmetros que afectam a alergenicidade das proteínas e que devem ser considerados no desenvolvimento de um sistema óptimo de digestão *in vitro* relevante fisiologicamente. Além do mais, o pré-processamento pela mastigação e deglutição também deve ser considerado. Isto significa que a aplicação de um modelo dinâmico deve ser a preferida [308].

O Instituto de Investigação Alimentar (BBSRC, Norwich, UK) tem desenvolvido um modelo dinâmico *in vitro* do estômago que simula a digestão humana e as condições encontradas no intestino delgado. Este considera factores como o vazio gástrico, quebra mecânica da matriz alimentar, etc, o que pode permitir uma simulação mais real da digestão gastrointestinal humana *in vivo* [308].

Tabela 7.5. – Factores relevantes na digestão gastrointestinal dos alergénios (adaptado de: [308]).

Digestão Gástrica	Digestão intestinal
Efeito tampão dos ingredientes alimentares	Aumento do pH
Quebra mecânica do tecido alimentar	Adição de surfactantes (fosfolípidos e sais de bÍlis) em quantidades fisiológicas
Gama de pH do estômago	Adição de proteases pancreáticas (tripsina e quimotripsina) em quantidades fisiológicas
Adição de surfactantes (fosfolípidos) em quantidades fisiológicas	Adição de lipases pancreáticas em quantidades fisiológicas
Adição de pepsina em quantidades fisiológicas	Trânsito intestinal
Adição de lipase gástrica em quantidades fisiológicas	Permeabilidade e absorção através da mucosa intestinal
Peristáltese	
Possível emulsificação dos lípidos	
Vazio gástrico	

8. Conclusão

A AA é uma reacção anormal a certas proteínas alimentares, dada pelo sistema imunológico do corpo, afectando 5% a 8% das crianças e 1% a 2% dos adultos. Envolvem a pele, o trato gastrointestinal e as vias respiratórias, podendo ser atribuídas aos mecanismos mediados por IgE ou aos não mediados por IgE (celulares). Pode resultar em doenças agudas ou crónicas e pode ser severa ou fatal. Os diagnósticos baseiam-se num historial clínico cuidado e na apreciação dos aspectos epidemiológicos, no papel e nas limitações dos testes de diagnóstico e, se necessário, nos testes dos desafios orais (*OFC*) para confirmar a alergia ou intolerância.

O tratamento baseia-se na eliminação dos alimentos indutores e numa resposta pronta tal como o uso de epinefrina (no caso de anafilaxia). Não existe nenhuma cura. Contudo, as imunoterapias específicas (oral e sublingual), a terapia anti-IgE e a produção dos anticorpos monoclonais são marcos importantes na terapêutica das AAs. Cerca de 90% das AAs são provocadas por um grupo de oito alimentos genéricos, onde se englobam o leite de vaca, ovo, a soja e o trigo, que geralmente são superadas até aos 3-5 anos, ao passo que nos casos do amendoim, frutos de casca rija, peixe e marisco/crustáceos podem perdurar até ao final da vida.

Os alergénios alimentares são normalmente glicoproteínas solúveis em água, com pesos moleculares oscilando entre 10-60 kDa, estáveis a pH ácido (2-5). Será importante comparar as estruturas dos compostos alérgicos e não alérgicos, de forma a se perceber quais as características de uma proteína que lhe conferem a sua alergenidade. Tem sido usado como critério a digestibilidade/resistência de uma proteína à degradação enzimática. Os alergénios de origem animal mais comuns são as proteínas do leite de vaca, do ovo, do marisco/moluscos e do peixe. A maioria dos alergénios de origem vegetal são homólogos das proteínas relacionadas com a patogénese (*PRs*), que são moléculas induzidas por patogénios ou feridas. Os outros alergénios não homólogos às *PRs* correspondem principalmente a duas superfamílias, as prolaminas (albuminas 2S; inibidores da α -amilase/tripsina; prolaminas dos cereais) e as cupinas.

A gestão do risco associado aos alergénios alimentares necessita de uma priorização. Os critérios que são aplicados, para se identificarem quais os alimentos de verdadeira significância, incluem a demonstração pelo diagnóstico de que se trata de uma reacção adversa mediada por IgE, as estimativas da severidade, prevalência e incidência das reacções, a potência alérgica do alimento e a sua extensão (caracterização do risco) e o padrão e natureza da exposição ao alimento.

As propriedades físico-químicas e bioquímicas que os caracterizam incluem a estabilidade térmica e a resistência à proteólise, as quais são reforçadas pela capacidade de ligação aos iões ligandos (iões metálicos), aos lípidos e aos esteróides. Outros tipos de interacções lipídicas com as membranas ou outras estruturas lipídicas, podem promover as propriedades alérgicas, tais como as ligações intramoleculares dissulfureto, as modificações pós-translacionais (tais como as N-glicosilações), as estruturas repetitivas, capacidade de formarem oligómeros e as reacções de glicação. O facto de uma dada proteína potencialmente alérgica, pertencer a uma família de um número limitado delas, por si só, não é suficiente para determinar a sua actividade alergénica.

Os ensaios de digestão permitiram classificar as proteínas alérgicas em duas classes, a Classe I, que são as resistentes à digestão gástrica e termoestáveis (provocam a sensibilização no trato gastrointestinal) e as da Classe II, que são as lábeis (não provocam sensibilização ou apenas por inalação). A reactividade cruzada corresponde às reacções cruzadas entre os diferentes alimentos e às reacções entre os alimentos e outros itens não alimentares.

A rotulagem obrigatória dos alergénios tem sido alvo de destaque nas instituições europeias. A sua detecção quantitativa é um objectivo estratégico da Saúde Pública. O *PCR* em tempo real e o *ELISA* são fundamentais no rastreio dos alimentos processados e embalados.

Actualmente, o método de *ELISA* é o mais utilizado ao nível qualitativo e quantitativo. Os imunoenaios são técnicas analíticas que utilizam anticorpos. Oferecem um método muito específico, sensível e rápido de detectar e quantificar, mesmo em quantidades vestigiais, tanto nas matérias-primas como nos produtos intermediários e nos alimentos finais. Permitem analisar muitas amostras, visto que os resultados são rápidos. Note-se contudo que, seja qual for o método utilizado, o essencial é que seja capaz de detectar e quantificar em matrizes alimentares, mesmo em concentrações reduzidas. A quantificação dos compostos tem como principal objectivo garantir, com um nível elevado de confiança, a sua ausência nos alimentos para o consumidor alérgico.

Os modelos de digestão *in vitro* avaliam a digestibilidade dos compostos. O teste mais usado é o da pepsina no fluido gástrico de simulação (*SGF*), podendo o rácio da pepsinólise ser influenciado pelo pH e pelo rácio de pepsina/proteína de teste. Os estudos têm revelado a importância do uso destes sistemas fisiológicos. Os modelos multifásicos, tendo em consideração o pré-processamento de mastigação e deglutição, o ambiente do estômago/duodeno, o efeito do trânsito gastrointestinal, outras enzimas digestivas, a matriz alimentar e outros componentes da dieta tais como os lípidos, devem ser os preferidos em relação aos tradicionais *in vitro* monofásicos (pepsinólise). A combinação destes modelos *in vitro* com os ensaios imunológicos (com reconhecimento pela IgE) deve ser a necessária para se estudar o potencial alergénico. Apesar de alguns dados contraditórios, a **digestibilidade ou**

estabilidade digestiva ainda é adoptada como um critério relevante. Usar a digestibilidade como único parâmetro não fornece informação suficiente para inferir acerca do verdadeiro potencial alérgico das proteínas, para uma avaliação de risco. Há a necessidade de estabelecer um ensaio standardizado a nível mundial, para que a comparação dos resultados possa ser feita.

As áreas que necessitam de maior investigação incluem a incidência, prevalência e epidemiologia; factores genéticos que influenciam estas patologias; biomarcadores da doença e da resposta ao tratamento; eficácia e segurança relacionadas com a utilização de terapias emergentes; e estratégias mais eficazes para educar os pacientes, famílias, profissionais de saúde e outras pessoas que possam proteger os pacientes em risco de anafilaxia.

9. Bibliografia

1. EUFIC, (2006) The basics – Food allergy and food intolerance. Disponível em: <http://www.eufic.org/article/en/expid/basicsfoodallergyintolerance/>. [Consultado in: 12-05-2015]
2. Johansson, S., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P., Bobby, Q., Lanier, B., Lockey, R., (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol.*, 113 (5), pp. 832-6.
3. Hodge, L., Swain, A., Faulkner-Hogg, K., (2009). Food allergy and intolerance. *Aust Fam Physician.*, 38 (9), pp. 705-7.
4. Ramesh, S., (2008) Food allergy overview in children. *Clin Rev Allergy Immunol*, 34 (2), pp. 217-30.
5. Dioun, A., Harris, S., Hibberd, P., (2003) Is maternal age at delivery related to childhood food allergy? *Pediatr Allergy Immunol.*, 14 (4), pp. 307-11.
6. Sicherer, S.H., Sampson, H.A., (2010) Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 125 (2), pp. 116-25.
7. Sicherer, S. H., (2011) Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 127 (3), pp. 594-602.
8. Vieira, M.C., Morais, M.B., Spolidoro, J.V., Toporovski, M.S., Cardoso, A.L., Araújo, G.T., et al., (2010) A survey on clinical presentation and nutritional status of infants with suspected cow' milk allergy. *BMC Pediatr.*, 10, pp. 25.
9. Boyce, J.A., Assa'ad, A., Burks, A.W., Jones, S.M., Sampson, H.A., Wood, R.A., et al., (2010) Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the UnitedStates: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol*, 126 (S), pp. 1-58.
10. Johansson, S., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P., Bobby, Q., Lanier, B., Lockey, R., (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol.*; 113(5), pp. 832-6.
11. Burks, A. W., MD, Tang, M., MBBS, Sicherer, S., (2012) ICON: Food allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, 129 (4), pp. 906-20.
12. Mills, E.N., Mackie, A.R., Burny, P., Beyer, K., Frewer, L., (2007) The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Allergy*; 62, pp. 717-722.

13. Panesar, S.S., Javad, S., De Silva, D., Nwaru, B.I., Hickstein, L., Muraro, A., Roberts, G., Worm, M., Bilò, M.B., Cardona, V., Dubois, A.E.J., Dunn Galvin, A., Eigenmann, P., Fernandez-Rivas, M., Halken, S., Lack, G., Niggemann, B., Santos, A.F., Vlieg-Boerstra, B., Zolkipli, Q., Sheikh, A., (2013) On behalf of the EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Group. The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy*, 68, pp. 1353–1361.
14. Branum, A.M., Lukacs, S.L., (2008) Food allergy among U.S. children: trends in prevalence and hospitalizations. *NCHS Data Brief*, 10, pp. 1-8.
15. Osborne, N.J., Koplin, J.J., Martin, P.E., Gurrin, L.C., Lowe, A.J., Matheson, M.C., (2011) Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol*, 127, pp. 668-76, e1-2.
16. EUFIC, (2006) The basics – Food allergy and food intolerance. Disponível em: <http://www.eufic.org/article/en/expid/basicsfoodallergyintolerance/>. [Consult in: 12-05-2015].
17. Lehrer, S. B., Ayuso, R., Reese, G., (2002) Current Understanding of Food Allergens. *New York Academy of Sciences*, 964, pp. 69-85.
18. Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R.J., Gislason, D., Madsen, C., Summers, C., (2008) The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol*, 121, pp. 1210-8, e4.
19. Lack, G., (2008) Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, 121, pp. 1331-6.
20. Almeida, M., Prates, S., Pargana, E., Arêde, C., Godinho, N., Tavares, C., (1999) Alergia Alimentar em Crianças numa consulta de imunoalergologia. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 7 (3), pp. 167-71.
21. Dias, A., Santos, A., Pinheiro, J.A., (2010) Persistence of cow's milk allergy beyond two years of age. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 38 (1), pp. 8-12.
22. D'Amato, G., Cecchi, L., D'Amato, M., Liccardi, G., (2010) Urban Air Pollution and Climate Change as Environmental Risk Factors of Respiratory Allergy: An Update. *J Invest Allergol Clin Immunol.*, 20 (2), pp. 95-102.
23. Sicherer, S.H., Teuber, S., (2004) Current approach to the diagnosis and management of adverse reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol.*, 114 (5), pp. 1146-50.
24. Nunes, M., Barros, R., Moreira, P., Moreira, A., Almeida, M. M., (2012) Alergia Alimentar. Ministério da Educação e Ciência - Direção-Geral da

- Educação, Ministério da Saúde - Direção-Geral da Saúde (Ed.), [ISBN: 978-972-742-356-9], pp. 1-22.
25. Untersmayr, E., Jensen-Jarolim, E., (2008) The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J Allergy Clin Immunol*, 121, pp. 1301-8.
 26. Vassallo, M.F., Banerji, A., Rudders, S.A., Clark, S., Mullins, R.J., Camargo, C.A., (2010) Jr. Season of birth and food allergy in children. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 104, pp. 307-13.
 27. Nwaru, B.I., Ahonen, S., Kaila, M., Erkkola, M., Haapala, A.M., Kronberg-Kippila, C., (2010) Maternal diet during pregnancy and allergic sensitization in the offspring by 5 yrs of age: a prospective cohort study. *Pediatr Allergy Immunol*, 21, pp. 29-37.
 28. Sicherer, S.H., Munoz-Furlong, A., Sampson, H.A., (2004) Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *J Allergy Clin Immunol*, 114, pp. 159-65.
 29. Liu, A.H., Jaramillo, R., Sicherer, S.H., Wood, R.A., Bock, S.A., Burks, A.W., (2010) National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol*, 126, pp. 798-806.
 30. Visness, C.M., London, S.J., Daniels, J.L., Kaufman, J.S., Yeatts, K.B., Siega-Riz, A.M., (2009) Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol*, 123, pp. 1163-9.
 31. Du Toit, G., Katz, Y., Sasieni, P., Mesher, D., Maleki, S.J., Fisher, H.R., (2008) Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 122, pp. 984-91.
 32. Lopez-Exposito, I., Song, Y., Jarvinen, K.M., Srivastava, K., Li, X.M., (2009) Maternal peanut exposure during pregnancy and lactation reduces peanut allergy risk in offspring. *J Allergy Clin Immunol*, 124, pp. 1039-46.
 33. Kumar, S., Verma, A. K., Das, M., Dwivedi, P. D., (2012) Allergenic Diversity among Plant and Animal Food Proteins. *Food Reviews International*, 28, pp. 277-298.
 34. Treudler, R., Kozovska, Y., Simon, J.C., (2008) Severe immediate type hypersensitivity reactions in 105 human adults: When to diagnose anaphylaxis. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 18, pp. 52-58.
 35. Schwartz, R.H., (1985) T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev.*

- Immunol., 3, pp. 237–61.
36. Moller, G., (1987). Antigen requirements for activation of MHC restricted responses. *Immunol. Rev.*, 98, pp. 1–187.
 37. Davis, M.M., Bjorkman, P., (1988) T cell antigen receptor genes and T cell recognition. *Nature*, 334, pp. 395–402.
 38. Li, W., Deanin, G.G., Margolis, B., Schlessinger, J., Oliver, J.M., (1992) Fc epsilon R1-mediated tyrosine phosphorylation of multiple proteins, including phospholipase C gamma 1 and the receptor beta gamma 2 complex, in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells. *Mol. Cell. Biol.*, 12, pp. 3176–3182.
 39. Kambayashi, T., Koretzky, G.A., (2007) Proximal signaling events in FcεRI-mediated mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119, pp. 544–552.
 40. Guo, Y., Li, Z., Hong, L., Haider, S., Jamil, K., (2009) Studies on the specific degranulation of mast cell sensitized by several allergens in vitro. *Cell. Mol. Immunol.*, 6, pp. 149–153.
 41. Wray, D., Vlagopoulos, T.P., Siraganian, R.P., (1982) Food allergens and basophil histamine release in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 54, pp. 388–395.
 42. Van der Leek, T.K., Liu, A.H., Stefanski, K., Blacker, B., Bock, S.A., (2000) The natural history of peanut allergy in young children and its association with serum peanut-specific IgE. *J Pediatr.*, 137, pp. 749–55.
 43. Verdú, J., (2005). *Nutrição para Educadores*. Edições Díaz de Santos (2ª Ed.), Espanha, pp. 491–492.
 44. Lidon, F., Silvestre, M., (2010) *Nutrição e Saúde – Alergia aos Alimentos*. In: F. Lidon, F., Silvestre, M. (Ed.). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*, Escolar Editora, Lisboa, Portugal, pp. 445–455.
 45. Bock, S.A., Munoz-Furlong, A., Sampson, H.A., (2001) Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol.*, 107, pp. 191–3.
 46. Ferreira, F., (2005) *Nutrição Humana*, (3ª Ed.). Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, pp. 1121–1123.
 47. Misra, A., Prasad, R., Das, M., Dwivedi, P.D., (2008) Prevalence of legume sensitization in patients with naso-bronchial allergy. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*, 30, pp. 529–542.
 48. Prasad, R., Verma, S.K., Dua, R., Kant, S., Kushwaha, R.A.S., Agarwal, S.P., (2009) A study of skin sensitivity to various allergens by skin prick

- test in patients of nasobronchial allergy. *LungIndia*, 26, pp. 70–73.
49. Kumar, S., Verma, A.K., Misra, A., Tripathi, A., Chaudhari, B.P., Prasad, R., Jain, S.K., Das, M., Dwivedi, P.D., (2011) Allergenic responses of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris cv chitra*) polypeptides in BALB/c mice recognized by bronchial asthma and allergic rhinitis patients. *Food Res. Int.*, 44, pp. 2868–2879.
50. Werfel, T., Breuer, K., (2004) Role of food allergy in atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 5, pp. 379–385.
51. Lucas, J.S., Grimshaw, K.E., Collins, K.W.J.O., Hourihane, J.O., (2004) Kiwi fruit is a significant allergen and is associated with differing patterns of reactivity in children and adults. *Clin. Exp. Allergy*, 34, pp. 1115–1121.
52. Spergel, J.M., Andrews, T., Brown-Whitehorn, T.F., Beausoleil, J.L., Liacouras, C.A., (2005) Treatment of eosinophilic esophagitis with specific food elimination diet directed by a combination of skin prick and patch tests. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 95, pp. 336–343.
53. Alcoceba, E., Gonzalez, M., Gaig, P., Figuerola, E., Auguet, T., Olona, M. (2010) Edema of the uvula: Etiology, risk factors, diagnosis, and treatment. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 20, pp. 80–83.
54. Wardhana, E.A., (2010) Datau. Recurrent aphthous stomatitis caused by food allergy. *Acta Med. Indones.*, 42, pp. 236–240.
55. Nowak-Wegryn, A., Muraro, A., (2009) Food protein-induced enterocolitis syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 9, pp. 371–377.
56. Sicherer, S.H., (2005) Food protein-induced enterocolitis syndrome: Case presentations and management lessons. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115, pp. 149–156.
57. Passariello, A., Terrin, G., Baldassarre, M.E., Curtis, M.D., Paludetto, R., Canani, R.B., (2010) Diarrhea in neonatal intensive care unit. *World J. Gastroenterol.*, 7 (16), pp. 2664–2668.
58. Sicherer, S. H., (2002) Food Allergy. *The Lancet*. 360, pp. 701-710.
59. Simonato, B., De Lazzari, F., Pasini, G., (2001) IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion. *Clin Exp Allergy*, 31, pp.1771–78.
60. Taylor, S.L, Hefle, S.L., (2001) Will genetically modified foods be allergenic?. *J Allergy Clin Immunol.*, 107, pp.765–71.
61. Akiyama, H., Imai, T., Ebisawa, M., (2011) Japan food allergen labeling

- regulation-history and evaluation. *Adv Food Nutr Res.*, 62, pp. 139-71.
62. Breiteneder, H., Ebner, C., (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol.*, 106, pp. 27-36.
63. Sociedade Brasileira de Pediatria, (2012) Manual de orientação para a alimentação do lactente, do pré-escolar, do escolar, do adolescente e na escola 3. Rio de Janeiro (Ed.), pp. 148.
64. Pereira, P.B., Silva, C.P., (2008) Alergia a proteína do leite de vaca em crianças: repercussões da dieta de exclusão e da dieta substitutiva sobre o estado nutricional. *Revista Pediatria, São Paulo*, 30 (2), pp.100-106.
65. EUFIC, (2014) Abordagem sobre os alergénios alimentares. Disponível em: <http://www.eufic.org/article/pt/artid/Abordagem-sobre-os-alergeneos-alimentares/>. [Consult in: 12-05-2015]].
66. Host, A., (2002) Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 89 (6), pp. 33-37.
67. Caffarelli, C., Baldi, F., Bendandi, B., Luigi, C., Marani, M., Pasquinelli, P., (2010) Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Italian Journal of Pediatrics*, 36 (5), pp. 1-7.
68. Kattan, J. D., Cocco, R. R., Järvinen, M. K., (2011) Milk and Soy Allergy. *Pediatr Clin North Am.*, 58 (2), pp. 407-426.
69. Lomer, M.C., (2008) Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 27 (2), pp. 93-103.
70. Tey, D., Heine, R.G., (2009) Egg allergy in childhood: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 9 (3), pp. 244-50.
71. Sáiz, J., Montealegre, C., Marina, M. L., García-Ruiz, C., (2013) Peanut Allergens: An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53, pp. 722-737.
72. Tariq, S.M., Stevens, M., Rideout, S., Twinselton, R., Hide, R.W., (1996) Cohort study of peanut and tree nut sensitization by age of 4 years. *BMJ*. 313, pp. 514-517.
73. Ortolani, C., Ballmer-Weber, B.K., Skamstrup Hansen, K., Ispano, M., Wütrich, B., Bindslev-Jensen, C., (2000) Hazelnut allergy: a double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study. *J Allergy Clin Immunol.*, 105, pp. 577-581.

74. Pastorello, E.A., Vieths, S., Pravettoni, V., Farioli, L., Trambaioli, C., Fortunato, D., (2002) Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol.*, 109, pp. 563–570.
75. Schocker, F., Lüttkopf, D., Scheurer, S., Petersen, A., Cisteró-Bahíma, A., Enrique, E., (2004) Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: a new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, 113, pp. 141–147.
76. Fleischer, D.M., Conover-Walker, M.K., Matsui, E.C., Wood, R.A., (2005) The natural history of tree nut allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, 116 (5), pp. 1087–1093.
77. Zak, D.L., Keeney, P.G., (1976) Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. *J Agric Food Chem*, 24 (3), pp. 483–486.
78. Pahr1, S., Constantin, C., Mari, A., Scheiblhofer, S., Thalhamer, J., Ebner, C., Vrtala1, S., Mittermann, I., Valenta, R. (2012) Molecular characterization of wheat allergens specifically recognized by patients suffering from wheat-induced respiratory allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 42, pp. 597–609.
79. Crevel, R.W., Kerkhoff, M.A., Koning, M.M., (2000) Allergenicity of refined vegetable oils. *Food Chem Toxicol.*, 38 (4), pp. 385-93
80. Helbling, A., Haydel, R Jr., McCants, M.L., Musmand, J.J., El-Dahr, J., Lehrer, S.B., (1999) Fish allergy: is cross-reactivity among fish species relevant? double-blind placebo controlled food challenge studies of fish allergic adults. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 83, pp. 517–523.
81. Ayuso, R., Lehrer, S.B., Solensky, R., (2003) Resolution of fish allergy: a case report. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 91, pp. 411–412.
82. Swoboda, I., Bugajska-Schretter, A., Verdino, P., (2002) Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J Immunol.*, 168, pp. 4576–4584.
83. Lehrer, S.B., McCants, M.L., (1987) Reactivity of IgE antibodies with crustacea and oyster allergens: evidence for common antigenic structures. *J Allergy Clin Immunol.*, 80, pp. 133–139.
84. Reese, G., Ayuso, R., Lehrer, S.B., (1999) Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol.*, 119, pp. 247–258.

85. Ayuso, R., Reese, G., Leong-Kee, S., (2002) Molecular basis of arthropod crossreactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol*, 129, pp. 38–48.
86. Waserman, S., Watson, W., (2011) Food allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7 (1), pp. 1-7.
87. Cianferoni, A., Spergel, J.M., (2009) Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int.*, 58 (4), pp. 457-66.
88. Crespo, J.F., James, J.M., Rodriguez, J., (2004) Diagnosis and therapy of food allergy. *Mol Nutr Food Res.*, 48 (5), pp. 347-55.
89. Ortolani, C., Ispano, M., Pastorello, E.A., Ansaloni, R., Magri, G.C., (1989) Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol.*, 83, pp. 683–90.
90. Eigenmann, P.A., Sampson, H.A., (1998) Interpreting skin prick tests in the evaluation of food allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol*, 9, pp. 186–91.
91. Bock, S., Buckley, J., Holst, A., May C., (1978) Proper use of skin tests with food extracts in diagnosis of food hypersensitivity. *Clin Allergy*, 8, pp. 559–64.
92. Sampson, H.A., Albergo, R., (1984) Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.*, 74, pp. 26–33.
93. Saarinen, K.M., Suomalainen, H., Savilahti, E., (2001) Diagnostic value of skinprick and patch tests and serum eosinophil cationic protein and cow's milk-specific IgE in infants with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2001, 31, pp. 423–29.
94. Sampson, H.A., Ho, D.G., (1997) Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol*, 100, pp. 444–51.
95. Terr, A.I., Salvaggio, J.E., (1996) Controversial concepts in allergy and clinical immunology. In: Bierman, C.W., Pearlman, D.S., Shapiro, G.G., Busse, W.W. (Ed.). *Allergy, asthma, and immunology from infancy to adulthood* (3rd Ed.). Philadelphia: WB Saunders, pp. 749–60.
96. Sicherer, S.H., (1999) Food allergy: when and how to perform oral food challenges. *Pediatr Allergy Immunol*, 10, pp. 226–34.
97. David, T.J., (1984) Anaphylactic shock during elimination diets for severe atopic dermatitis. *Arch Dis Child*, 59, pp. 983–86.

98. Caffarelli, C., Petroccione, T., (2001) False-negative food challenges in children with suspected food allergy. *Lancet*, 358, pp. 1871–72.
99. Spergel, J.M., Pawlowski, N.A., (2002) Food allergy, Mechanisms, diagnosis, and management in children. *Pediatr Clin North Am.*, 49 (1), pp. 73-96.
100. Berni Canani, R., Ruotolo, S., Discepolo, V., Troncone, R., (2008) The diagnosis of food allergy in children. *Curr Opin Pediatr.*, 20 (5), pp. 584-9.
101. Beyer, K., Teuber, S.S., (2005) Food allergy diagnostics: scientific and unproven procedures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 5 (3), pp. 261-6.
102. Joint Task Force on Practice Parameters, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, American College of Allergy, Asthma and Immunology, and the Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology, (1998) The diagnosis and management of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 101 (S), pp. 465–528.
103. Simons, F.E., Roberts, J.R., Gu, X., Simons K.J., (1998) Epinephrine absorption in children with a history of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.*, 101, pp. 33-37.
104. Sicherer, S.H., Forman, J.A., Noone, S.A., (2000) Use assessment of self administered epinephrine among food-allergic children and pediatricians. *Pediatrics*, 105, pp. 359–62.
105. Sampson, H.A., Mendelson, L.M., (1992) Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med*, 327, pp. 380–84.
106. Wasserman, S., Watson, W., (2011) Food allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7 (1), pp. 1-7.
107. Connors, L., Wasserman, S., (2010) Food allergy — the nuts and bolts. *Parkhurst Exchange*, 18. Disponível em: <http://www.parkhurstexchange.com/clinicalreviews/apr10/food-allergy> [Consult in: October 14-05- 2015].
108. Ewan, P.W., Clark, A.T., (2001) Long-term prospective observational study of patients with peanut and nut allergy after participation in a management plan. *Lancet*. 357, pp. 111–15.
109. Fiocchi, A., Bouygue, G.R., Martelli, A., Terracciano, L., Sarratud, T., (2004) Dietary treatment of childhood atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS). *Allergy*, 59 (178), pp. 78-85.
110. Greer, F.R., Sicherer, S.H., Burks, A.W., (2008) Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the

- role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics*, 121, pp. 183-91.
111. Nelson, H.S., Lahr, J., Rule, R., Bock, A., Leung, D., (1997) Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol.*, 99, pp. 744-51.
112. Buchanan, A.D., Green, T.D., Jones, S.M., Scurlock, A.M., Christie, L., Althage, K.A., (2007). Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, 119, pp. 199-205.
113. Hofmann, A.M., Scurlock, A.M., Jones, S.M., Palmer, K.P., Lokhnygina, Y., Steele, P.H., (2009) Safety of a peanut oral immunotherapy protocol in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, 124, pp. 286-91.
114. Nadeau, K.C., Schneider, L.C., Hoyte, L., Borrás, I., Umetsu, D.T., (2011) Rapid oral desensitization in combination with omalizumab therapy in patients with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, 127, pp. 1622-4.
115. Arshad, S.H., (2005) Primary prevention of asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, 116 (1), pp. 3-14.
116. Board of Directors, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, (1998) Anaphylaxis in schools and other childcare settings. *J Allergy Clin Immunol.*, 102, pp. 173-76.
117. Tiainen, J.M., Nuutinen, O.M., Kalavainen, M.P., (1995) Diet and nutritional status in children with cow's milk allergy. *Eur J Clin Nutr*, 49, pp. 605-12.
118. Christie, L., Hine, R.J., Parker, J.G., Burks, W., (2002) Food allergies in children affect nutrient intake and growth. *J Am Diet Assoc.*, 102, 1648-51.
119. Vadas, P., Wai, Y., Burks, W., Perelman, B., (2001) Detection of peanut allergens in breast milk of lactating women. *JAMA*, 285, pp.1746-48.
120. Isolauri, E., Tahvanainen, A., Peltola, T., Arvola T. (1999) Breast-feeding of allergic infants. *J Pediatr*, 134, pp.27-32.
121. Zeiger, R.S., Heller, S. (1995) The development and prediction of atopy in high risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *J Allergy Clin Immunol.*, 95, pp.1179-90.
122. Sigurs, N., Hattevig, G., Kjellman, B., (1992) Maternal avoidance of eggs, cow's milk, and fish during lactation: Effect on allergic manifestation, skin prick tests, and specific IgE antibodies in children at age 4 years. *Pediatr*, 89, pp. 735-39.

123. Zeiger, R., Heller, S., Mellon, M., Halsey, J., Hamburger, R., Sampson, H., (1992) Genetic and environmental factors affecting the development of atopy through age 4 in children of atopic parents: a prospective randomized study of food allergen avoidance. *Pediatr Allergy Immunol.*, 3, pp. 110–27.
124. Tecnoalimentar, (2014). Nova Rotulagem dos Alimentos já está em vigor. Tecnoalimentar, Revista da Indústria Alimentar. Disponível em: <http://tecnoalimentar.pt/2014/12/15/novarotulagemdosalimentosjaestaemvigor/>. [Consult in: 16-05-2015], pp. 1-3.
125. Associação dos directores de hotéis de Portugal, (2014) Novas Regras de Rotulagem e Informação Obrigatória para Clientes. Disponível em: <http://adhp.org/2014/12/novas-regras-de-rotulagem-e-informacao-obrigatoria-para-clientesgal/>. [Consult in: 16-05-2015].
126. Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D., Madsen, C., (2007). The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 120, pp. 638–646.
127. Sampson, H.A., (2003) Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics*, 111, pp. 1601–1608.
128. Gaudin, J. C., Rabesona, H., Choiset, Y., Yeretssianw, G., Chobert, J.M., Sakanyanwz, V., Drouet, M., Haertl'e, T., (2008) Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to ilk-specific proteins in allergic patients using microarrays. *Clin. Exp. Allergy*, 38, pp. 686-693.
129. Docena, G.H., Fernandez, R., Chirido, F. G., Fossati, C.A., (1996). Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*, 51, pp. 412-416.
130. Anet, J., Back, J.F., Baker, R.S., Barnette, D., Burley, R.W., Howden, M.E.H., (1985). Allergens in the white and yolk of hen's egg. A study of IgE binding by egg proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 77, pp. 364-371.
131. Lehrere, S.B., Ayuso, R., Reese, G., (2003) Seafood allergy and allergens: A review. *Mar. Biotechnol*, 5, pp. 339–348.
132. Taylor, S.L., (2008) Molluscan shellfish allergy. *Adv. Food Nutr. Res.*, 54, pp. 139–177.
133. Untersmayr, E., Vestergaard, H., Malling, Hans-Jørgen., Jensen, L.B., Platzer, M.H., Boltz Nitulescu, G., Scheiner, O., Skov, P.S., Erika, J.J., Lars, K.P., (2007). Incomplete digestion of codfish represents a risk factor for anaphylaxis in patients with allergy Denmark. *J. Allergy Clin. Immunol.* , 119, pp. 711–717.

134. Ayuso, R., Grishina, G., Ibanez, M.D., Blanco, C., Carrillo, T., Benchaitiwong, R., Sanchez, S., Nowak-Wegrzyn, A., Sampson, H.A., (2009) Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF hand typeprotein identified as a new shrimp allergen. *J. Allergy Clin. Immuno*, 124, pp. 114-20.
135. Ayuso, R., Grishina, G., Bardina, L., (2008) Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *J Allergy Clin. Immunol*, 122, pp. 795–802.
136. Shiomi, K., Sato, Y., Hamamoto, S., Mita, H., Shimakura, K., (2008) Sarcoplasmic calcium binding protein: Identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Int. Arch Allergy Immunol.*, 146, pp. 91–98.
137. Tuinier, R., Rolin, C., de Kruif, C.G., (2002). Electrosorption of pectin onto casein micelles. *Biomacromolecules*, 3, pp. 632–638.
138. Spuerger, P., Walter, M., Schiltz, E., Deichmann, K., Forster, J.M., (1997) Allergenicity of alpha caseins from cow, sheep, and goat. *Allergy*, 52, pp. 293-298.
139. Hoffmann-Sommergruber, K., Clare Mills, E.N., (2009) Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: New data from the EuroPrevall project. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395, pp. 25–35.
140. Bernhisel-Broadbent, J., Dintzis, H.M., Dintzis, R.Z., Sampson, H.A., (1994) Allergenicity and anti- genicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 93, pp. 1047–1059.
141. Karin, H.S., Mills, E.N.C., (2009) Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: New data from the EuroPrevall project. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395, pp. 25–35.
142. Wa, J.M., (2002) Cow's milk proteins/allergens. *Ann. Allergy Asthma Immunol*, 89, pp. 3–10.
143. Moreno, F.J., Alfonso, C., (2008) 2S Albumin storage proteins: What makes them food allergens?. *Open Biochem. J.*, 2, pp. 16–28.
144. Scheurer, S., Lauer, I., Foetisch, K., Moncin, M.S.M., Retzek, M., Hartz, C., Enrique, E., Lidholm, J., Cistero-Bahima, A., Vieths, S., (2004) Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J. Allergy Clin. Immunol*, 114, pp. 900–907.
145. Van, R.R., (2002) Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as

- food allergens. Biochem. Soc. Trans., 30, pp. 910–913.
146. Muntz, K., (1998) Deposition of storage proteins, Plant Mol Biol, 38, pp. 77-99.
147. Shewry, P.R., Beaudoin, F., Jenkins, J., Griffiths-Jones, S., Mills, E.N., (2002) Plant protein families and their relationships to food allergy. Biochem Soc Trans, 30, pp. 906-10.
148. Maruyama, N., Ichise, K., Katsube, T., Kishimoto, T., Kawase, S., Matsumura, Y., et al., (1998) Identification of major wheat allergens by means of the Escherichia coli expression system. Eur J Biochem, 255, pp.739-45.
149. Palosuo, K., Varjonen, E., Kekki, O.M., Klemola, T., Kalkkinen, N., Alenius, H., et al., (2001) Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. J Allergy Clin Immunol., 108, pp. 634-8.
150. Breiteneder, H., Radauer, C., (2004) A classification of plant food allergens. J Allergy Clin Immunol. 113, pp. 821 – 30.
151. Wensing, M., Knulst, A.C., Piersma, S., O’Kane, F., Knol, E.F., Koppelman, S.J., (2003) Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). J Allergy Clin Immunol, 111, pp. 420 – 4.
152. Vieths, S. Scheurer, S., Ballmer-Weber, B., (2002) Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. Ann N Y Acad Sci., 964, pp. 47 – 68.
153. Jenkins, J.A., Griffith-Jones, S., Shewry, P.R., Breiteneder, H., Mills, E.N.C., (2005) Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. J Allergy Clin Immunol, 115, pp. 164 – 71.
154. Gao, Z.S., Van de Weg, W.E., Schaart, J.G., Van Arkel, G., Breiteneder, H., Hoffmann, S.K., Gilissen, L.J.W.J., (2005) Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). Theor. Appl. Genet., 111, pp. 171–183.
155. Pons, L., Chery, C., Romano, A., Namour, F., Artesani, M.C., Gueant, J.L., (2002) The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. Allergy, 57, pp. 88–93.
156. Hoffmann-Sommergruber, K., (2000) Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? Int. Arch. Allergy Immunol., 122, pp. 155–166.
157. Hiemori, M., Ito, H., Kimoto, M., Yamashita, H., Nishizawa, K., Maruyama, N., Utsumi, S., Tsuji, H., (2004) Identification of the 23-kDa peptide derived

- from the precursor of Gly m Bd 28K, a major soybean allergen, as a new allergen. *Biochim. Biophys. Acta*, 18, pp. 174–183.
158. Leone, P., Menu-Bouaouiche, L., Peumans, W.J., Payan, F., Barre, A., Roussel, A., Van Damme, E.J., Rouge, P., (2006) Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å. *Biochimie*, 88, pp. 45–52.
 159. Laskowski, M., Kato, I., (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem*, 49, pp. 593-626.
 160. Burks, A.W., Cockrell, G., Connaughton, C., Guin, J., Allen, W., Helm, R.M., (1994) Identification of peanut agglutinin and soybean trypsin inhibitor as minor legume allergens. *Int Arch Allergy Immunol*, 105, pp. 143-9.
 161. Moroz L.A., Yang, W.H., (1980) Kunitz soybean trypsin inhibitor: a specific allergen in food anaphylaxis. *N Engl J Med*, 302, pp. 1126-8.
 162. Gu, X., Beardslee, T., Zeece, M., Sarath, G., Markwell, J., (2001) Identification of IgE-binding proteins in soy lecithin. *Int Arch Allergy Immunol.*, 126, pp. 218-25.
 163. Seppala, U., Majamaa, H., Turjanmaa, K., Helin, J., Reunala, T., Kalkkinen, N., et al., (2001) Identification of four novel potato (*Solanum tuberosum*) allergens belonging to the family of soybean trypsin inhibitors. *Allergy*, 56, pp. 619-26.
 164. Rawlings, N.D., Barrett, A.J., (1994) Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol*, 244, pp. 461-86.
 165. Kamphuis, I.G., Drenth, J., Baker, E.N., (1985) Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J Mol Biol*, 182, pp. 317-29.
 166. Pastorello, E.A., Conti, A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Ansaloni, R., (1998) Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol*, 101, pp. 531-7.
 167. Cuesta-Herranz, J., Pastor, C., Figueredo, E., Vidarte, L., De las Heras, M., Duran, C., (2003) Identification of cucumisin (Cuc m 1), a subtilisin-like endopeptidase, as the major allergen of melon fruit. *Clin Exp Allergy*, 33, pp. 827-33.
 168. Björkstén, B., Crevel, R., Hischenhuber, C., Løvik, M., Samuels, F., Strobel, S., Taylor, S.L., Wal, J.-M., Ward, R., (2008) Criteria for identifying allergenic foods of public health importance, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51, pp. 42-52.

169. Bousquet, J., Björkstén, B., Brujinzeel-Koomen, C.A., Huggett, A., Ortolani, C., Warner, J.O., (1998) Scientific criteria and the selection of allergenic foods for product labelling. *Allergy*, 53, pp. 3–21.
170. Barlow, S.M., Dybing, E., Edler, L., Eisenbrand, G., Kroes, R., Van den Brandt, P., (2002) Food Safety in Europe (FOSIE): risk assessment of chemicals in food and diet. *Food Chem. Toxicol.*, 40, pp. 139–427.
171. Sicherer, S.H., (2000) Determinants of systemic manifestations of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, pp. S251–S257.
172. Taylor, S.L., Hefle, S.L., Bindslev-Jensen, C., Bock, S.A., Burks Jr., A.W., Christie, L., (2002) Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *J. Allergy Clin. Immunol.*, 109, pp. 24–30.
173. Food and Agriculture Organisation, (1995) Food Allergies. Report of the Technical Consultation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, November 13–14.
174. Østerballe, M., Bindslev-Jensen, C., (2003) Threshold levels in food challenge and specific IgE in patients with egg allergy: is there a relationship? *J. Allergy Clin. Immunol.*, 112, pp. 196–201.
175. Perry, T.T., Matsui, E.C., Kay Conover-Walker, M., Wood, R.A., (2004) The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 114, pp. 144–149.
176. Brujinzeel-Koomen, C., Ortolani, C., Aas, K., Bindslev-Jensen, C., Björkstén, B., Moneret-Vautrin, D., (1995) Adverse reactions to food European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy*, 50, pp. 623–625.
177. Malmheden-Yman, I., Eriksson, A., Everitt, G., Yman, L., Karlsson, T., (1994) Analysis of food proteins for verification of contaminants or mislabeling. *Food Agric. Immunol.* 6, pp. 167–172.
178. Gern, J.E., Yang, E., Evrard, H.M., Sampson, H.A., (1991) Allergic reactions to milk-contaminated ‘non-dairy’ products. *N. Engl. J. Med.*, 324, pp. 976–979.
179. Laoprasert, N., Wallen, N.D., Jones, R.T., Hefle, S.L., Taylor, S.L., Yunginger, J.W., (1998). Anaphylaxis in a milk-allergic child following ingestion of lemon sorbet containing trace quantities of milk. *J. Food Prot.*, 61, pp. 1522–1524.
180. Sancho, A.I., Foxall, R., Rigby, N.M., Browne, T., Zuidmeer, L., van Ree, R., (2006) Maturity and storage influence on the apple (*Malus domestica*) allergen Mal d 3, a nonspecific lipid transfer protein. *J. Agric. Food Chem.*, 54, pp.

5098–5104.

181. Wilwert, J.L., Madhoun, N.M., Coughlin, D.J., (2006) Parvalbumin correlates with relaxation rate in the swimming muscle of sheepshead and kingfish. *J. Exp. Biol.*, 209, pp. 227–337.
182. Crevel, R.W.R., Briggs, D., Hefle, S.L., Knulst, A.C., Taylor, S.L., (2007) Hazard characterization in food allergen risk assessment: the application of statistical approaches and the use of clinical data. *Food Chem. Toxicol.*, 45, pp. 691–701.
183. Bindslev-Jensen, C., Briggs, D., Østerballe, M., (2002) Can we determine a threshold level for allergenic foods by statistical analysis of published data in the literature? *Allergy*, 57, pp. 741–746.
184. Taylor, S.L., Hefle, S.L., Bindslev-Jensen, C., Atkins, F.M., Andre, C., Bruijnzeel-Koomen, C., (2004) A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Clin. Exp. Allergy*, 34, pp. 689–695.
185. Bush, R.K., Taylor, S.L., Nordlee, J.A., Busse, W.W., (1985) Soybean oil is not allergenic to soybean-sensitive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 76, pp. 242–245.
186. Hansen, T.K., Poulsen, L.K., Skov, P.S., Hefle, S.L., Hlywka, J.J., Taylor, S.L., et al., (2004) A randomized, double-blinded, placebo-controlled oral challenge study to evaluate the allergenicity of commercial, foodgrade fish gelatin. *Food Chem. Toxicol.*, 42, pp. 2037–2044.
187. Fiocchi, A., Bouygue, G.R., Sarratud, T., Terracciano, L., Martelli, A., Restani, P., (2004a) Clinical tolerance of processed foods. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 93, pp. S38–S46.
188. Davis, P.J., Smales, C.H., James, D.C., (2001) How can thermal processing modify the allergenicity of proteins? *Allergy*, 56, pp. 56–60.
189. Sampson, H.A. (2004) Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113, pp. 805–819.
190. Østerballe, M., Hansen, T.K., Mortz, C.G., Host, A., Bindslev-Jensen, C., (2005) The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 16, pp. 567–573.
191. Young, E., Stoneham, M.D., Petrukevitch, A., Barton, J., Rona, R., (1994) A population study of food intolerance. *Lancet*, 343, pp. 1127–1130.
192. Fuglsang, G., Madsen, C., Saval, P., Østerballe, O., (1993) Prevalence of intolerance to food additives among Danish school children. *Pediatr. Allergy*

- Immunol., 4, pp. 123–129.
193. Zuberbier, T., Edenharter, G., Worm, M., Ehlers, I., Reimann, S., Hantke, T., et al., (2004). Prevalence of adverse reactions to food in Germany—a population study. *Allergy*, 59, pp. 338–345.
 194. Sicherer, S.H., Munoz-Furlong, A., Sampson, H.A., (2003) Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 112, pp. 1203–1207.
 195. Wensing, M., Penninks, A.H., Hefle, S.L., Koppelman, S.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Knulst, A.C., (2002) The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 110, pp. 915–920.
 196. Wang, J., Sampson, H.A., (2007) Food anaphylaxis. *Clin. Exp. Allergy*, 37, pp. 651–660.
 197. Malmheden-Yman, I., (2004) Detection of inadequate labelling and contamination as causes of allergic reactions to food. *Acta Alimentaria*, 33, pp. 347–357.
 198. Heckmann, T., Neumann, B., Tschirdewahn, B., Bentler, W., (1992) Sojaprotein: Nachweis in Rohwurst und Brühwurst (Soya protein: determination in dry sausage and frankfurter-type sausage). *Fleischwirtschaft*, 72, pp. 1426–1427.
 199. Foucard, T., Malmheden-Yman, I., (1999) A study on severe food reactions in Sweden—is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis *Allergy*, 54, pp. 261–265.
 200. Leduc, V., Moneret-Vautrin, D.A., Guerin, L., Morisset, M., Kanny, G., (2003) Anaphylaxis to wheat isolates: immunochemical study of a case proved by means of double-blind, placebo-controlled food challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111, pp. 897–899.
 201. Fiocchi, A., Restani, P., Bernardo, L., Martelli, A., Ballabio, C., D’Auria, E., (2004b) Tolerance of heat-treated kiwi by children with kiwifruit allergy. *Pediatr. Allergy Immunol*, 15, pp. 454–458.
 202. Anderson, J.A., Sogn, D.D. (Eds.), (1984) Adverse reactions to foods. NIH Publication Nr. 84-2442, pp. 1-6.
 203. Lemanske, R.F., Taylor, S.L., (1987) Standardized extracts, Foods. *Clin Rev Allergy*, 5, pp. 23-36.
 204. Metcalfe, D.D., (1985) Food allergens. *Clin Rev Allergy*, 3, pp. 331-349.

205. Breiteneder, H. e Mills, E.N.C. (2005) Molecular properties of food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115 (1), pp. 14-23
206. Hauser, M., Egger, M., Wallner, M., Wopfner, N., (2008) Molecular properties of plant food allergens, a current classification into protein families. *Open Immunol. J.*, 1, pp. 1–12.
207. DBT, (2008) *Protocols for Food and Feed Safety Assessment of GE Crops*. Department of Biotechnology, Ministry of Science and Technology, Government of India: New Delhi.
208. Creamer, L.K., (1995) Effect of sodium dodecyl sulfate and palmitic acid on the equilibrium unfolding of bovine beta-lactoglobulin. *Biochemistry*, 34, pp. 7170-6.
209. Douliez, J.P., Jegou, S., Pato, C., Molle, D., Tran, V., Marion, D., (2001) Binding of two mono-acylated lipid monomers by the barley lipid-transfer protein, LTP1, as viewed by fluorescence, isothermal titration calorimetry and molecular modelling. *Eur J Biochem*, 268, pp. 384-8.
210. Fu, T., Abbott, U.R., Hatzos, C., (2002) Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluids: A comparative study. *J. Agric. FoodChem.*, 50, pp. 7154–7160.
211. Kumar, S., Verma, A.K., Misra, A., Tripathi, A., Chaudhari, B.P., Prasad, R., Jain, S.K., Das, M., Dwivedi, P.D., (2011) Allergenic responses of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris cv chitra*) polypeptides in BALB/c mice recognized by bronchial asthma and allergic rhinitis patients. *Food Res. Int.*, 44, pp. 2868–2879.
212. Burks, A.W., Williams, L.W., Thresher, W., Connaughton, C., Cockrell, G., Helm, R.M., (1992) Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90, pp. 889–897.
213. Pastorello, E., (2004) Allergy to peanuts. *EFSA J.*, 34, pp. 76–84.
214. Wigotzki, M., Steinhart, H., Paschke, A., (2001) Determination of the allergenicity of various hazelnut products by immunoblotting and enzyme allergosorbent test inhibition. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl*, 756, pp. 239–248.
215. Van Ree, R., (2002) Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol*, 129, pp. 189-97.
216. Foetisch, K., Westphal, S., Lauer, I., Retzek, M., Altmann, F., Kolarich, D., (2003) Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate

- determinants. *J Allergy Clin Immunol*, 111, pp. 889-96.
217. Bublin, M., Radauer, C., Wilson, I.B., Kraft, D., Scheiner, O., Breiteneder, H., (2003) Cross-reactive N-glycans of *Api g 5*, a high molecular weight glycoprotein allergen from celery, are required for immunoglobulin E binding and activation of effector cells from allergic patients. *FASEB J.*, 17, pp. 1697-9.
218. Pedrosa, C., De Felice, F.G., Trisciuzzi, C., Ferreira, S.T., (2000) Selective neoglycosylation increases the structural stability of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds. *Arch Biochem Biophys*, 382, pp. 203-10.
219. Van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J.P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., (2000) Beta (1, 2)-xylose and alpha (1, 3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem.*, 275, pp. 11451-8.
220. Duranti, M., Horstmann, C., Gilroy, J., Croy, R.R., (1995). The molecular basis for N-glycosylation in the 11S globulin (legumin) of lupin seed. *J Protein Chem.*, 14, pp. 107-10.
221. Chirino, A.J., Ary, M.L., Marshall, S.A., (2004) Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov. Today*, 9, pp. 82-90.
222. Braun, A., Kwee, L., Labow, M.A., Alsenz, J., (1997) Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice. *Pharm Res.*, 14, pp. 1472-8.
223. MacLeod, A.R., (1987) Genetic origin of diversity of human cytoskeletal tropomyosins. *Bioessays*, 6, pp. 208-12.
224. Brett, G.M., Mills, E.N.C., Goodfellow, B.J., Fido, R.J., Tatham, A.S., Shewry, P.R., (1999) Epitope mapping studies of broad specificity monoclonal antibodies to cereal prolamins. *J Cereal Sci*, 29, pp. 117-28.
225. Wolf, W.J., Nelsen, T.C., (1996) Partial purification and characterization of the 15S globulin of soybeans, a dimer of glycinin. *J Agric Food Chem*, 44, pp. 785-91.
226. Yamauchi, F., Yamagishi, T., Iwabuchi, S., (1991) Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. *Food Rev Internat*, 7, pp. 283-322.
227. Mills, E.N., Marigheto, N.A., Wellner, N., Fairhurst, S.A., Jenkins, J.A., Mann, R., (2003) Thermally induced structural changes in glycinin, the 11S globulin of soya bean (*Glycine max*)—an in situ spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta*, 1648, pp. 105-14.
228. Koppelman, S.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Hessing, M., de Jongh, H.H.,

- (1999) Heatinduced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J Biol Chem*, 274, pp. 4770-7.
229. Tian, S.F., Toda, S., Higashino, H., Matsumura, S., (1996) Glycation decreases the stability of the triple-helical strands of fibrous collagen against proteolytic degradation by pepsin in a specific temperature range. *J Biochem (Tokyo)*, 120, pp. 1153-62.
230. Maleki, S.J., Chung, S.Y., Champagne, E.T., Raufman, J.P., (2000) The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 106, pp. 763-8.
231. Chung, S.Y., Butts, C.L., Maleki, S.J., Champagne, E.T., (2003) Linking peanut allergenicity to the processes of maturation, curing, and roasting. *J Agric Food Chem*, 51, pp. 4273-7.
232. Breiteneder, H.; Mills, E.N.C., (2005) Plant food allergens—Structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnol. Adv.*, 23, 395–399.
233. The Doctors Laboratory, (2014) Cross Reactivity. Disponível em: <http://www.tdlpathology.com/test-information/profiles-allergy/cross-reactivity>. [Consult in: 11-02-2015].
234. Sicherer, Scott H., (2001) Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108 (6), pp. 881-890.
235. Bernhisel-Broadbent, J., Taylor, S., Sampson, H.A., (1989) Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. II. Laboratory correlates. *J. Allergy Clin.Immunol.*, 84, pp. 701–709.
236. Astwood, J.D., Leach, J.N., Fuchs, R.L., (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol*, 14, pp.1269-73.
237. Host, A., Halken, S., (1990). A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first three years of life: clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy*, 45, pp.587-96.
238. Bircher, A.J., Van Melle, G., Haller, E., Curty, B., Frei, P.C., (1994) IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy. *Clin Exp Allergy*, 24, pp. 367-74.
239. Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Kraft, D., (1995). Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE crossreactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol*, 95, pp. 962-9.
240. Amlot, P.Z., Kemeny, D.M., Zachary, C., Parkes, P., Lessof, M.H., (1987). Oral allergy syndrome (OAS) symptoms of IgE mediated hypersensitivity to foods.

- Clin Allergy, 17, pp. 33-42.
241. Vieths, S., Jankiewicz, A., Wuthrich, B., Baltes, W., (1995) Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 75, pp. 48-55.
 242. Kirsch, S., Fourdrilis, S., Dobson, R., Scippo, M.&, Maghuin-Rogister, G. De Pauw, E. &. (2009) Quantitative methods for food allergens: a review, *Anal Bioanal Chem*, 395, pp. 57–67.
 243. Johnson, P., Sancho, A., Crevel, R., Mills, E., (2011) Detection of Allergens in Foods. In: L. Nollet, A. van Hengel (Ed.). *Food Allergens – Analysis Instrumentation and Methods*, CRC Press, Boca Raton, EUA. pp. 20-23.
 244. Monaci, L., Visconti, A., (2009) Trends, *Anal Chem*, 28, pp. 581–591.
 245. Monaci, L., Visconti, A., (2012) Allergens. In: Y. Picó (Ed.), *Chemical Analysis of Food: Techniques and Application*, Elsevier Inc, Waltham, EUA. pp. 701-707.
 246. Diaz-Amigo, C., Popping, B., (2010) Detection of Food Allergens. In: Popping, B., Diaz-Amigo, C., Hoenicke, K. (Ed.), *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, EUA. pp 176-177, 185-186.
 247. Ismail, B., Reuhs, B., Nielsen, S., (2010) Analysis of Food Contaminants, Residues, and Chemical Constituents of Concern. In: S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis*, Springer, New York, EUA. pp. 319-344.
 248. Schubbert, R., (2010) Molecular Biology Laboratory Layout. In: Popping, B., Diaz-Amigo, C., Hoenicke, K. (Ed.), *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, EUA, 7, pp. 1-10.
 249. Mafra, I., Ferreira, I., Oliveira, P.P., Beatriz, M., (2008) Food authentication by PCR-based methods: review. *Eur Food Res Technol*, 227, pp. 649-665.
 250. Poms, R.E., Klein, C.L., Anklam, E., (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Add Contam*, 21, pp. 1-31.
 251. Kerbach, S., Alldrick, A., Crevel, R., Dömötör, L., DunnGalvin, A., Mills, E., Pfaff, S., Poms, R., Popping, B., Tömösközi, S., (2009) Managing Food Allergens in the food Supply Chain –Viewed from Diferent Stakeholder Perspectives. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1 (1), pp. 50-60.
 252. Campbell, N. A., Reece, J. B., Mitchell, L. G., (1999) *Biology* (5th Ed). 2725 Sand Hill Road Menlo Park, CA 94025: Benjamin/Cummings, Addison Wesley Longman, Inc., pp. 371-372.

253. Broll, H., (2010) Polymerase Chain Reaction. In: B. Popping, C. Diaz-Amigo, K. Hoenicke (Ed.) Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, EUA. pp 41-47, 51.
254. Teiga, P., Ladeiras, R., Marques, S., (2005) Polymerase Chain Reaction. [Consult in: 11-02-2015]. <http://medicina.med.up.pt/bcm/trabalhos/2005/pcr%20finalissima.ppt#276,1>, Polymerase Chain Reaction (PCR).
255. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., (2003) Brock Biology of Microorganisms (10th Ed.), Upper Saddle River, NJ 07458, London: Pearson Education, Inc. pp. 168, 169, 264, 375-376, 815.
256. Besler, M., (2011) Determination of allergens in foods. Trends Anal Chem, 11, pp. 662-672.
257. Slowianek, M., Majak, I., (2011) Methods of Allergen Detection Based on DNA Analysis. Biotechnology and Food Science, 75 (2), 39-44.
258. Hirao, T., Hiramoto, M., Imai, S., Kato, H., (2006) J Food Prot, 69, pp. 2478–2486.
259. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., (2006) The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 27 (2-3), pp. 95-125.
260. Saiki, R.K., (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230, pp. 1350.
261. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. Bio-Technology, 10 (4), pp. 413-417.
262. Schoringhumer, K., Cichna-Markl, M., (2007) Development of a real-time PCR method to detect potentially allergenic sesame (*Sesamum indicum*) in food. J Agric Food Chem, 55, pp. 10540-10547.
263. Hupfer, C., Waiblinger, H.U., Busch, U., (2007) Development and validation of a real-time PCR detection method for celery in food. Eur Food Res Technol, 225, pp. 329-335.
264. Mustorp, S., Engdahl-Axelsson, C., Svensson, U., Holck, A., (2008) Detection of celery (*Apiumgraveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica*

- nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR. Eur Food Res Technol, 226, pp. 771-778.
265. Novais, C., Pires-Alves, M., Silva, F., (2004) PCR em Tempo Real. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento n.º 33, pp. 10-13.
 266. Holzhauser, T., Wangorsch, A., Vieths, S., (2000) Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes. Eur Food Res Technol, 211, pp. 360-365.
 267. Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T., (1988) "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification". Nucleic Acids Research, 16 (23), pp. 11141–11156.
 268. Köppel, R., Dvorak, V., Zimmerli, F., Breitenmoser, A., Eugster, A., Waiblinger, H.U., (2010) Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. Eur Food Res Technol, 230, pp. 367-374.
 269. Blais, B.W., Gaudreault, M., Phillippe, L.M., (2003) Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods. Food Control, 14, pp. 43-47.
 270. Van Hengel, A.J., (2007) Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers: review, Anal Bioanal Chem, 389, pp. 111-118.
 271. Kerbach, S., Alldrick, A., Crevel, R., Dömötör, L., DunnGalvin, A., Mills, E., Pfaff, S., Poms, R., Popping, B., Tömösközi, S. (2009) Managing Food Allergens in the food Supply Chain –Viewed from Diferent Stakeholder Perspectives. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 1 (1), pp. 50-60.
 272. Diaz-Amigo, C., (2010) Antibody-Based Detection Methods: From Theory to Practice. In: B. Popping, C. Diaz-Amigo, K. Hoenicke (Ed.), Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists. Hoboken, New Jersey, EUA: John Wiley & Sons Inc., pp. 223, 226-234.
 273. Hsieh, Y., (2010) Immunoassays. In: S. Nielsen (Ed.), Food Analysis. New York, EUA: Springer, pp. 306-309, 311-313.
 274. Câmara, B., (2015) Biomedicina Padrão – ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Disponível em: <http://www.biomedicinapadrao.com.br/2010/05/elisa.html> [Consult in: 04-05-2015].]
 275. (S. A.), (2015) Western blot. Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot. [Consult in: 04-05-2015].

276. Smith, D., (2010) Protein Separation and Characterization Procedures. In: S. Nielsen (Ed.), Food Analysis. New York, EUA: Springer, pp. 267-268, 270.
277. Shriver, S. K., Yang, W. W., (2011) Thermal and Nonthermal Methods for Food Allergen Control, Food Eng., 3, pp. 26-43.
278. Falagiani, P., Mistrello, G., Rapisarda, G., Festa, A., Cislighi, C., Zanoni, D., (1994) Evaluation of allergenic potency by reast inhibition—a new tool for the standardization of allergenic extracts. J Immunol Methods, 173 (2), pp. 181–190.
279. Merget, R., Stollfuss, J., Wiewrodt, R., Fruhauf, H., Koch, U., (1993) Diagnostic tests in enzyme allergy. J Allergy Clin Immunol, 92 (2), pp. 264–277.
280. Magdeldin, S., Zhang, Y., Xu, B., Yoshida, Y., Yamamoto, T., (2012) Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis –A Practical Perspective. In: S. Magdeldin (Ed.), Gel Electrophoresis -Principles and Basics, Rijeka, Croácia: InTech, pp. 91-92.
281. Koeberl, M., Clarke, D. L., Lopata, L., (2014) Next Generation of Food Allergen Quantification Using Mass Spectrometric Systems, Journal of Proteome Research, pp. A-K.
282. Crowle, A. J., (1961) Immunodiffusion. New York: Academic Press.
283. Qudin, J., (1946) Immunochemical methods of analysis involving selective precipitation in solidified media. Compt Rend Acad Sci, 22, pp. 115–116.
284. (S. A.), (2015) Precipitin 1. Disponível em: https://www.google.pt/search?q=Tube+Precipitin+Test+IMMUNODIFFUSION&rlz=1C1VASM_enPT53PT546&espv=2&biw=1280&bih=699&source=Imms&tbm=isch&sa=X&ei=PY9GVYfoI4P2UoTHgOgEved=0CAYQ_AUoAQ#imgsrc=C00djKkdpwIZ3M%253A%3B3G0NsMaYDVAAbFM%3Bhttp%253A%252F%252Fclasses.midlandstech.edu%252Fcarterp%252FCourses%252Fbio225%252Fchap18%252Fslide14.GIF%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.slideshare.net%252Frubina1000%252Fprecipitin-1%3B960%3B720 [Consult in: 04-05-2015].
285. Mancini, G., Carbonara, A. O., Heremans, J. F., (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. In: Immunochemistry. Oxford: Pergamon Press, pp. 235–254.
286. (S. A.), (2015) Immunodiffusion techniques. Disponível em: http://www.slideshare.net/suniu/immunodiffusion-principles-and-application?from_action=save. [Consult in: 04-05-2015].

287. Outcherlony, O., (1949) Antigen antibody reaction in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 26, pp. 507–515.
288. Grabar, P., Williams, C.A., (1953) Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguine. *Biochim Biophys Acta*, 10, pp. 193–194.
289. Linden, G., (1996) *Analytical Techniques for Foods and Agricultural Products*. New York: VCH Publishers, Inc.
290. O'Farrell, B., (2009) Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. In: R. Wong, H. Tse (Ed.), *Lateral Flow Immunoassay*. New York, EUA: Springer, pp. 3-5.
291. Cytodiagnostics, (2015) Lateral Flow Immunoassays. Disponível em: <http://www.cytodiagnostics.com/store/pc/Lateral-Flow-Immunoassays-d6.htm>. [Consult in: 29-04-2015].
292. IUPAC, (2012) *Compendium of Chemical Terminology –Gold Book*, Version 2.3.2. International Union of Pure and Applied Chemistry, pp 166, 273.
293. Bremer, M., (2009). Selecting a Suitable Food Allergen Detection Method, *Food Safety Magazine*.
294. Monaci, L., Visconti, A., (2009) Mass Spectrometry-Based Proteomics Methods for Analysis of Food Allergens. *Trends in Analytical Chemistry*, 28 (5), pp. 581-591.
295. Cajka, T., Hajslova, J., Mastovska, K., (2009) Mass Spectrometry and Hyphenated Instruments in Food Analysis. In: S. Otles (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments*. Boca Raton, EUA: CRC Press, pp. 198, 204-206.
296. Dass, C., (2007) Basics of Mass Spectrometry. In: C. Dass (Ed.), *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. New Jersey, EUA: John Wiley & Sons Inc., pp 5-6.
297. Turnipseed, S., (2006) The Use of Mass Spectrometry in Food Analysis. In: Y. Hui, J. Culbertson, S. Duncan, I. Guerrero-Legarreta, E. Li-Chan, C. Ma, C. Manley, T. McMeekin, W. Nip, L. Nollet, M. Rahman, F. Toldr, Y. Xiong (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. Boca Raton, EUA: CRC Press, 1, pp. 48/1-48/2.
298. Smith, J., Thakur, R., (2010) Mass Spectrometry. In: S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis*. New York, EUA: Springer, pp. 459.
299. García-Ruiz, C., Marina, M., (2009) Capillary Electrophoresis in Food Analysis. In: S. Otles (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments*, Boca Raton, EUA: CRC Press, pp. 404.

300. Xu, Y., (1996). Tutorial: Capillary Electrophoresis. *The Chemical Educator*, 1 (2), pp. 1-14.
301. Sampson, H. A., (2000) Food anaphylaxis. *Br. Med. Bull.*, 56, pp. 925-935.
302. Fuchs, R. L., Ream, J. E., Hammond, B. G., Naylor, M. W., Leimgruber, R. M., Berberich, S. A., (1993) Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Bio/Technology*, 11, pp. 1543-1547.
303. Momma, K., Hashimoto, W., Ozawa, S., Kawai, S., Katsube, T., Takaiwa, F., Kito, M., Utsumi, S., Murata, K., (1999) Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analysis of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 63, pp. 314-318.
304. Besler, M., Steinhart, H., Paschke, A., (2001) Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr. B*, 756, pp. 207-228.
305. Taylor, S. L., Lemanske, R. F., Jr., Bush, R. K.; Busse, W. W., (1987) Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann. Allergy*, 59, pp. 93-99.
306. Fuchs, R. L.; Astwood, J. D., (1996) Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technol.*, pp. 83-88.
307. Harrison, L. A., Bailey, M. R., Naylor, M. W., Ream, J. E., Hammond, B. G., Nida, D. L., Burnette, B. L., Nickson, T. E., Mitsky, T. A., Taylor, M. L., Fuchs, R. L., Padgett, S. R., (1996) The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyru-vylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutr.*, 126, pp. 728-740.
308. Javier Moreno, F., (2007) Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61, pp. 50-60.
309. Metcalfe, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.S., Taylor, S.L., Fuchs, R.L., (1996) Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit. Rev Food SciNutr.*, 36, pp. S165-86.
310. Taylor, S.L., Lehrer, S.B., (1996) Principles and characteristics of food allergens. *Crit Rev Food SciNutr.*, 36, pp. 91-118.
311. Board of Trustees (Ed), (1995) Simulated gastric fluid. In: *The United States pharmacopeia 23, The National Formulary 18*. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, Inc., pp. 2053.
312. FAO/WHO, (2001) Evaluation of allergenicity of genetically modified food; Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods

- derived from biotechnology. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
313. Kenna, J.G., Evans, R.M., (2000) Digestibility of proteins in simulated gastric fluid. *Toxicologist*, 54, pp. 141.
314. Fu, T. J., (2002) Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment. *Ann NY AcadSci*, 964, pp. 99-110.
315. Mills, E.N.C., Jenkins, J.A., Shewry, P.R., (2004) The role of common properties in determining plant food protein allergenicity. In: Mills ENC, Shewry PR, editors. *Plant food allergens*. Oxford: Blackwell Publishing, pp. 158-70.
316. Kreis, M., Forde, B.G., Rahman, S., Mifflin, B.J., Shewry, P.R., (1985) Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J MolBiol*, 183, pp. 499-502.
317. Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S., (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*, 7, pp. 945-56.
318. Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., de Vries, S.C., Gautier, M.F., Ciurana, L.F., (2000) Lipid transfer protein: a panallergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol*, 122, pp. 20-32.
319. Mills, E.N.C., Moreno, J., Sancho, A., Jenkins, J.A., Wichers, H.J., (2004) Processing approaches to reducing the allergenicity of foods. In: Yada R, editor. *Proteins in food processing*. Cambridge: Woodhead Publishing, pp. 396-418.
320. Mine, Y., Zhang, J.W., (2002) Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *J Agric Food Chem*, 50, pp. 2679-83.
321. Racusen, D., Foote, M., (1980) A major soluble glycoprotein of potato tubers. *J Food Biochem*, 4, pp. 43-52.
322. Creamer, L.K., (1995) Effect of sodium dodecyl-sulfate and palmitic acid on the equilibrium unfolding of bovine beta-lactoglobulin. *Biochemistry*, 34, pp. 7170-6.
323. Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G.A., Bartels, M., Dearman, R.J., Esdaile, D.J., (2004) A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol*, 39, pp. 87-98.
324. Codex Alimentarius Commission, (2003) Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy 30 June - 5 July, 2003. Appendix III, Guideline for the

- p>conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants and Appendix IV, Annex on the assessment of possible allergenicity, pp. 47-60.
325. Aalberse, R.C., (1997) Food allergens. *Environ Toxicol Pharmacol*, 4, pp. 55-60.
 326. VanRee, R., (1997) The oral allergy syndrome. In: Amin, S., Lahti, A., Maibach, H.I. (Ed). *Contact urticaria syndrome*. London: CRC Press, pp. 289-99.
 327. Chen, Z.P., Posch, A., Cremer, R., Raulf-Heimsoth, M., Baur, X., (1998) Identification of hevein (Hev b 6.02) In: *Hevea latex as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy*. *J Allergy ClinImmunol*, 102, pp. 476-81.
 328. Mikkola, J.H., Alenius, H., Kalkkinen, N., Turjanmaa, K., Palosuo, T., Reunala, T., (1998) Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana. *J Allergy ClinImmunol*, 102, pp. 1005-12.
 329. Yagami, T., Haishima, Y., Nakamura, A., Osuna, H., Ikezawa, Z., (2000) Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. *J Allergy ClinImmunol*, 106, pp. 752-62.
 330. Scheurer, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J., Skov, P.S., Ballmer-Weber, B., Wuthrich, B., (2001) Cross-reactivity within the profiling panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pruav 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2. *J Chromatogr B AnalytTechnol Biomed Life Sci*, 756, pp. 315-25.
 331. Jankiewicz, A., Baltes, W., Bogl, K.W., Dehne, L.I., Jamin, A., Hoffmann, A., (1997) In vitro study of the gastrointestinal stability of celery allergens. *Food AgricImmunol*, 9, pp. 203-17.
 332. Schlamowitz, M., Peterson, L.U., (1959) Studies on the optimum pH for the action of pepsin on native and denatured bovine serum albumin and bovine haemoglobin. *J BiolChem*, 234, pp. 3137-45.
 333. Jensen-Jarolim, E., Untersmayr, E., (2006) Food safety: In vitro digestion tests are non-predictive for allergenic potential of food in stomach insufficiency. *ImmunolLett*, 102, pp. 118-9.
 334. Untersmayr, E., Poulsen, L.K., Platzner, M.H., Pedersen, M.H., Boltz-Nitulescu, G., Skov, P.S., (2005) The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. *J Allergy ClinImmunol*, 115, pp. 377-82.

335. Untersmayr, E., Scholl, I., Swoboda, I., Beil, W.J., Forster-Waldl, E., Walter, F., (2003) Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: A fish allergy model in Balb/c mice. *J Allergy Clin Immunol*, 112, pp. 616 - 23.
336. Scholl, L., Untersmayr, E., Bakos, N., Roth-Walter, F., Gleiss, A., Boltz-Nitulescu, (2005) Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans. *Am J Clin Nutr*, 81, pp. 154-60.
337. Untersmayr, E., Bakos, N., Scholl, I., Kundi, M., Roth-Walter, F., Szalai, K., (2005) Anti-ulcer drugs promote IgE formation toward dietary antigens in adult patients. *FASEB J*, 19, pp. 656-58.
338. Tyssandier, V., Reboul, E., Dumas, J.F., Bougteloup-Demange, C., Armand, M., Marcand, J., (2003) Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284, pp. (G) 913-23.
339. Fordtran, J.S., Locklear, T.W., (1966) Ionic constituents and osmolality of gastric and small-intestinal fluids after eating. *Am J Dig Dis*, 11, pp. 503-21.
340. Fallingborg, J., Christensen, L.A., Ingemannielsen, M., Jacobsen, B.A., Abildgaard, K., Rasmussen, H.H., (1989) pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device. *Aliment Pharmacol Ther*, 3, pp. 605-13.
341. Mills, E.N.C., Jenkins, J.A., Robertson, J.A., Griffiths-Jones, S., Shewry, P.R., (2004) Identifying allergenic proteins in food. In: Watson DH, editor. *Pesticides, veterinary and other residues in food*. Cambridge: Woodhead Publishing, pp. 577-97.
342. Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H., Sawada, J-I., (2003) Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol Pharm Bull*, 26, pp. 969-73.
343. Venkatachalam, M., Teuber, S.S., Peterson, W.R., Roux, K.H., Sathe, S.K., (2006) Antigenic stability of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] proteins: Effects of thermal treatments and in vitro digestion. *J Agric Food Chem*, 54, pp. 1449-58.
344. DocumentaGeigy, (1973) Gastric juice. In: Diem K, Lentner C, (7th Ed), *Scientific tables*. Summit: Geigy Pharmaceuticals, pp. 646-51.
345. Teuber, S.S., (2002) Hypothesis: the protein body effect and other aspects of food matrix effects. *Ann NY Acad Sci*, 964, pp. 111-6.

- 346. Grimshaw, K.E.C., King, R.M., Nordlee, J.A., Hefle, S.L., Warner, J.O., Hourihane, J.O.B., (2003) Presentation of allergen in different food preparations affects the nature of the allergic reactionda case series. *Clin Exp Allergy*, 33, pp. 1581-5.
- 347. Mouécoucou, J, Villaume, C., Sanchez, C., Méjean, L., (2004) beta-lactoglobulin/polysaccharide interactions during in vitro gastric and pancreatic hydrolysis assessed in dialysis bags of different molecular weight cut-offs. *Biochim Biophys Acta*, 1670, pp. 105-12.
- 348. Mouécoucou J, Villaume C, Sanchez C, Me'jean L., (2004) Effects of gum arabic, low methoxy pectin and xylan on in vitro digestibility of peanut protein. *Food Res Int*, 37, pp. 777-83.
- 349. Mouécoucou, J., Frémont, S., Sanchez, C., Villaume, C., Méjean, L., (2004) In vitro allergenicity of peanut after hydrolysis in the presence of polysaccharides. *Clin Exp Allergy*, 34, pp. 1429-37.
- 350. Moreno, F.J., Mackie, A.R., Mills, E.N.C., (2005) Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion. *J Agric Food Chem*, 53, pp. 9810-6.

10. ANEXOS

ANEXO I

Tabela 2.2. - Rácios das prevalências estimadas das principais alergias alimentares, incluindo as idades, em estudos recentes (adaptado de: [7]).

Alimento alvo	Prevalência
Principais alergénios ou mais abrangentes	Literatura revista abrangente:
	Auto-relatório, 12-13%
	População em geral, 3%
	População geral (4 alimentos), 2,5% (USA)
	1 ano, 6% (USA)
	Até 3 anos, 5-6% (UK)
	6 anos, 3,7% (Dinamarca)
	Crianças em geral, 3,9% (USA)
	22 anos, 1,7% (Dinamarca)
Leite	Geral, 0,9%
	Geral, 0,4% (USA)
	1 ano, 3,8% (USA)
	Até 3 anos, 2,9% (UK)
	1-5 anos, 1,8% (US)
	3-5 anos, 0,5% (Israel)

Alergénios Alimentares: Um Estudo Sinóptico

Alimento alvo	Prevalência
Ovo	<p>Geral, 0,3%</p> <p>Geral, 0,2% (USA)</p> <p>3 anos, 2% (UK)</p> <p>1-5 anos, 1,8% (US)</p>
Amendoim	<p>Geral, 0,75%</p> <p>Geral, 1,3% (USA)</p> <p>Crianças: 1,7% (Canadá), 1,4% (USA), 1,9% (UK), 0,2% (Israel).</p> <p>Adultos: 0,7% (Canadá), 0,6% (USA).</p> <p>1 ano, 0,6% (USA)</p> <p>Até 3 anos, 1,2% (UK)</p> <p>4-6 anos, 0,6% (Singapura)</p> <p>1-5 anos, 1,8% (US)</p> <p>5-8 anos, 1,6% (Canadá)</p> <p>Até 6 anos, 1,2% (Austrália)</p>
Frutos de casca rijá	<p>Geral, 0,1-4,3%; até 4,5% (SPT); até 8,5% (sintomas).</p> <p>Geral, 1,1% (Canadá), 0,6% (USA)</p> <p>Adultos, 0,5% (US), 1% (Canadá)</p> <p>Crianças, 1,1% (US), 1,6% (Canadá)</p> <p>14-16 anos, 0,8% (Singapura)</p>

(Cont.)

Alergénios Alimentares: Um Estudo Sinóptico

Alimento alvo	Prevalência
Peixe	<p>Geral, 0,3%</p> <p>Geral, 0,5% (Canadá), 0,4% (USA)</p> <p>3 anos, 0,5% (UK)</p> <p>Adultos, 0,6% (Canadá), 0,5% (USA)</p> <p>Crianças, 0,2% (Canadá, USA)</p>
Marisco	<p>Geral, 0,6%</p> <p>Geral, 1,4% (Canadá), 1-2% (USA)</p> <p>Adultos, 1,7% (Canadá), 2,5% (USA)</p> <p>Crianças, 0,5% (Canadá, USA)</p> <p>14-16 anos, 5,2% (Singapura)</p>
Soja	<p>Geral, 0-0,7%</p> <p>1 ano, 1,4% (USA)</p>
Sementes	<p>Geral, <1%</p> <p>geral, 0,1% (Canadá, USA)</p> <p>Até 3 anos, 0,6% (UK)</p>
Trigo	<p>Geral, 0-0,5%; até 1,2% (SPT); até 1,3% (sintomas)</p> <p>1 ano, 0,5% (USA)</p> <p>Até 3 anos, 0,4% (UK)</p>
Frutas	<p>Geral, 0,1-4,3%; até 4,2% (SPT); até 8,5% (sintomas)</p> <p>1 ano, 1,2% (USA)</p>

(Cont.)

ANEXO II

Tabela 2.5. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia às proteínas do leite (fonte: [24]).

Alimentos a excluir	Leite de vaca, leite de cabra, leite de ovelha, leite condensado, leite evaporado, leite desnatado, leite em pó Iogurtes, queijo (qualquer tipo), requeijão, queijo fresco, manteiga, natas, papas lácteas com leite para crianças
Preparações culinárias/receitas	Purê, empadão, bocalhau com natas, gratinados com molho bechamel, bifinhos com cogumelos, stroganoff, carne e peixe frita ou panada com leite, todas as receitas com leite, manteiga, queijo, iogurte, natas ou molho bechamel Bolos, sobremesas, semitrios e gelados, crepes, batidos Creme de leite de ovos, gelados com leite, alimentos confeccionados com leite, refeições com leite como purê, bifes com cogumelos, refeições com molhos, refeições pré confeccionadas
Alimentos processados que podem conter o alérgeno	Produtos de pasteleria e confeitaria (bolos e pastéis), gelados, semifrios, chocolate, bombons caramelizados, pudins, nougat, caramelo, cremes de pasteleria, margarina, manteiga de cacau, bolachas, alguns tipos de pão (pães de leite, bicos de pato), salsichas e enchidos, molhos
Ingredientes na rotulagem	Leite evaporado, leite desnatado, leite em pó, soro, soro de leite, caseína, hidrolisado de caseína, caseinato, coalho de caseína, lactalbumina, fosfato de lactalbumina, lactoglobulina, lactulose, lactose, lactato de sódio/cálcio, aromas, aroma artificial de manteiga, gordura de manteiga, óleo de manteiga

ANEXO III

Tabela 2.6. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia ao ovo (fonte: [24]).

Alimentos a excluir	Ovos (galinha, codorniz, peru, pata, avestruz) Gema e clara de ovo
Preparações culinárias/receitas	Sopas com ovo (canja), salgados (rissóis, bolinhos de bacalhau, croquetes, panados), maionese, gemada, alimentos pincelados com ovo (empadão, empadas, folhados), omeletes, bacalhau à Brás, bacalhau à Gomes de Sá, salada russa, entre outras receitas que levem ovo Bolos, sobremesas, gelados com ovo
Alimentos processados que podem conter o alérgico	Produtos de pastelaria e confeitaria (bolos, biscoitos, torrados, empadas, salgados), pães com ovo (pães de leite e bicos de pato), massas com ovos, massa tenra, massa folhada, molhos (maionese, molho holandês, entre outros), hambúrgueres, salsichas, bolachas
Ingredientes na rotulagem	Ovo em pó desidratado, albumina, lisozima, lecitina de ovo, apovitina, avelina, avidina, flavoproteína, globulina, livetina, ovoalbumina, ovoglobulina, ovoglicoproteína, ovomucina, ovomucóide

ANEXO IV

Tabela 2.7. - Alimentos a excluir para o caso da alergia ao amendoim e aos frutos de casca rija (fonte: [24]).

Alimentos a excluir	Amendoim Amêndoa Avelã Coco Caju Noz Pinhão Pistacho Sementes de sésamo
Alimentos processados que podem conter o alergénio	Amendoim Manteiga de amendoim, rebuçados, pastéis e óleo de amendoim, gelados, bolachas, cereais (muesli)
	Amêndoa Pastéis, pastas, cremes, gelados, torrões, produtos de pastelaria, sobremesas e bolos caseiros
	Avelã Doces, chocolates, bombons, licores e pratos de culinária, pão
	Coco Óleo de coco, leite de coco, muesli, alguns produtos de pastelaria, chocolates, gelados
	Caju Alguns pratos de culinária, doces
	Noz Algumas confeções culinárias, doces, gelados, bolos, pão
	Pinhão Doces, enchidos (morcela), arroz com pinhões
	Pistacho Gelados, doces, biscoitos
	Sementes de sésamo Cereais, hambúrgueres, molhos, saladas, massas orientais, bolachas, aperitivos, cones de gelado, pão

ANEXO V

Tabela 2.8. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia ao trigo (fonte: [24]).

Alimentos a excluir	<p>Esparguete e massas, couscous, farinha de trigo, farinhas de trigo para uso culinário produtos de pastelaria e padaria (bolos, pastéis, biscoitos, bolachas), todos os tipos de pão ou broa, tostas, flocos de cereais, gelados com bolachas ou biscoitos, papas lácteas e não lácteas com trigo, chocolates com bolacha.</p> <p>Sopas pré-confecionadas, molhos</p> <p>Seitan</p>
Preparações culinárias/receitas	<p>Pratos de massa, canja, outras sopas com massas, pastéis salgados (rissóis, croquetes, empadas), panados, pizza, lasanha, francesinha</p>
Alimentos processados que podem conter o alergénio	<p>Chocolates e bombons</p> <p>Patés</p> <p>Enchidos e produtos de charcutaria</p> <p>Pão de centeio, milho</p> <p>Molho de soja</p> <p>Delícias do mar</p>
Ingredientes na rotulagem	<p>Sémola de trigo, semolina, farelo, gérmen, glúten, malte e amido de trigo, hidrolisado de farelo de trigo</p>

ANEXO VI

Tabela 2.9. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia à soja (fonte: [24]).

Alimentos a excluir	Soja, feijão de soja, rebentos de soja Tofu, molho de soja, molho shoyu, miso Farinha de soja Rebentos de soja, óleo de soja
Preparações culinárias/receitas	Receitas de pratos vegetarianos, chineses e japoneses Saladas com rebentos de soja
Alimentos processados que podem conter o alergénio	Carnes frias, salsichas, patés Produtos de pastelaria e panificação (bolos, pastéis, biscoitos, bolachas) Gelados de soja Óleos alimentares de origem vegetal e molhos Iogurtes e bebidas de soja (leite de soja) Sumos de fruta
Ingredientes na rotulagem	Lecitina de soja (E322) Hidrolisado de proteínas vegetais Albumina de soja Fibra de soja

ANEXO VII

Tabela 2.10. - Alimentos a excluir e ingredientes a mencionar na rotulagem, para o caso da alergia ao peixe (fonte: [24]).

Alimentos a excluir	Peixes brancos: pescada, linguado, galo, nero, cherne, corvina, garoupa Peixes azuis: atum, sardinha, truta, salmão, arenque, cavala, enguia
Preparações culinárias/receitas	Caldeirada, massa de peixe, arroz de marisco, salada russa, farinha de pau com peixe, outras receitas com peixe
Alimentos processados que podem conter o alergénio	Atum em lata Empadas, rissóis, bolinhos de bacalhau Molhos, sopas desidratadas, patés
Ingredientes na rotulagem	Farinha de peixe, parvalbumina,

ANEXO VIII

Tabela 2.11. - Alimentos a excluir para o caso da alergia ao marisco (crustáceos) e aos moluscos (fonte: [24]).

Alimentos a excluir	Caranguejo	Lagosta	Camarão	Maxilhão	Ostras
	Ameijoas	Lulas	Polvo	Chocos	
Preparações culinárias/receitas	Molho de francesinha, arroz de marisco, receitas de peixe com molho de marisco, arroz de peixe, caldeirada de peixe, massa de peixe, paté				
Alimentos processados que podem conter o alergénio	Molho de francesinha, arroz de marisco, receitas de peixe com molho de marisco, arroz de peixe, caldeirada de peixe, massa de peixe, paté				

ANEXO IX

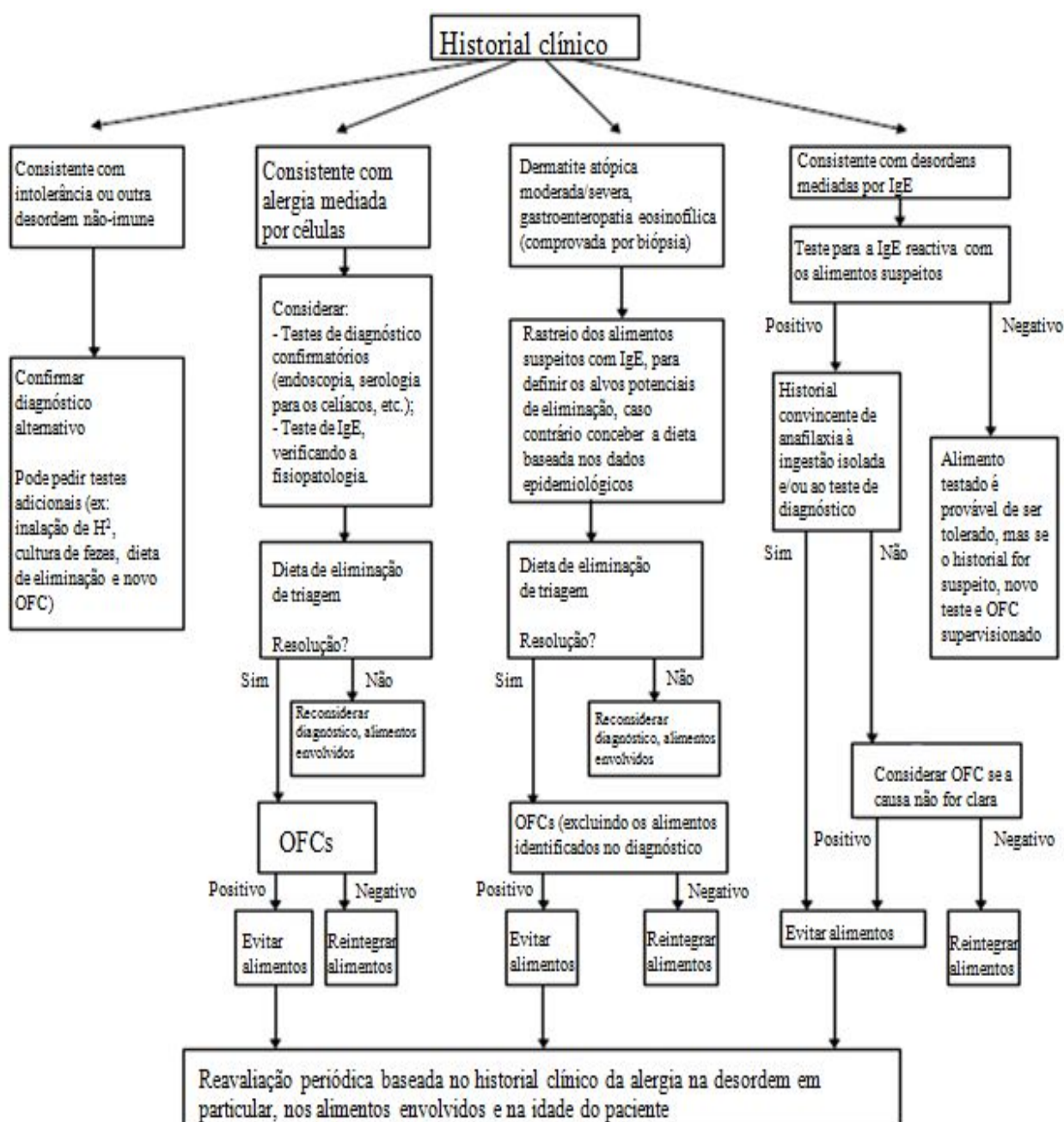


Figura 2.3. – Esquema geral do diagnóstico de uma alergia alimentar (adaptado de: [58]).

* - Em alguns casos, os testes com resultados positivos para as IgEs específicas de certos alimentos, poderão indicar uma alta probabilidade de alergia clínica.

ANEXO X

Tabela 5.1. - Exemplos de reactividades cruzadas entre alimentos e outros agentes vegetais ou animais (adaptado de: [233]).

Alergénio	Relevância clínica	Ocorrência frequente	Possível ocorrência
Maçã	Média	Bétula,	Aipo, cereja, pêra, batata, azevém, tomate
Abacate	Média	Latéx	Banana, kiwi
Banana	Forte	Latéx	Abacate, bétula, kiwi, melão
Pólen das bétulas			Amêndoa, maçã, alperce, cenoura, aipo, cereja, coentros, avelã, mel, kiwi, nectarinas, pêra, pêssego, amendoim, pimenta, ameixa, batata, ameixa seca, espinafres, nozes, trigo
Cenoura	Forte	Bétula, aipo, artemísia	Pepino, alfaces, manga, melão
Cereja	Leve	-	Bétula, maçã, pêssego
Ovo de galinha	Forte	Canário, frango pato, ganso, papagaio, cinza africana, periquito, pombo	-
Bacalhau	Leve	-	Carpa, enguia, arenque, cavalinha, solha, salmão, atum
Milho	Leve	-	Cevada, aveia, soja, azevém, arroz, trigo
Caranguejo	Leve	-	Ostra, camarão, lula
Castanha	Média	Latéx	-
Uva	Leve	-	Pêssego
Avelã	Forte	Avelã e outras nozes	Bétula, Kiwi, artemísia, pêssego, sementes de papoila e de sésamo, farinha de trigo
Kiwi	Média	Bétula, latéx	Abacate, banana, avelã, artemísia, sementes de papoila, farinha de centeio, azevém, sésamo
Borracha do latéx	Forte	Abacate, banana, castanha, louro, figo, kiwi. Manga, melão, papaia, tomate	Maçã, bétula, trigo, cenoura, aipo, figo, artemísia, laranja, orégãos, maracujá, pêssego
Melão	Média	Aipo, látex, ambrósia	Banana, cenoura, pepino, abobrinha
Cebola	Leve	-	Espargos, alho
Papaia	Leve	Latéx	-
Paprica	Leve	-	Bétula, aipo, artemísia
Ervilha	Leve		Lentilhas, artemísia, amendoim
Amendoim	Forte	Tomate	Látex, lentilhas, artemísia, parietária, ervilha, pêssego, soja
Pêra	Média	-	Macã, bétula, artemísia,

Alergénios Alimentares: Um Estudo Sinóptico

			pêssego
Pimenta	Leve	-	Aipo, bétula, artemisia
Ananás	Leve	-	Látex, azevém
Carne de porco	Média	Gato doméstico	-
Batata	Leve		Maçã, bétula, látex, tomate
Tomate	Leve	Bétula, amendoim, azevém	Maçã, aipo, látex, artemisia, batata
Nozes	Leve	Outros frutos secos	Pêssego

(Cont.)

ANEXO XI

Tabela 2.12. – Estratégias imunoterapêuticas seleccionadas (adaptado de: [6]).

Terapia	Raciocínio Imunológico	Benefícios	Observações até à data
Imunoterapia subcutânea standard (alergénios nativos)	Apresentação dos antígenos nos locais de distorção dos linfócitos <i>Th1</i> , que não são da mucosa	Provado para venenos e alergia respiratória, possivelmente (pólen) para a OAS	Evitada em caso de de risco de anafilaxia (ex: amendoim)
Imunoterapia sublingual/Oral (OIT)	Apresentação dos antígenos na mucosa permite dessensibilização e poderá induzir tolerância	Alimentos naturais, risco reduzido de anafilaxia sistémica comparada com as injeções	Evidências para a dessensibilização e segurança relativa; efeito na tolerância não claro
Vacina com proteína modificada	Activação da IgE reduzida por mutação dos epítomos de ligação à IgE	Forma mais segura de imunoterapia, comparada com a injeção de proteína nativa	Modelos murinos revelaram promessas; estudos humanos em decurso
Vacina de péptidos (sobreposição de péptidos)	Os péptidos ligam-se de forma cruzada, com menor probabilidade, à IgE, evitando a activação dos mastócitos	Não tem requisitos para o mapeamento/mutação dos epítomos para a IgE	Limitada
Conjugação de sequências imunes estimulantes do alergénio e métodos adjuvantes adicionais	Despoletar a resposta dos linfócitos Th2 por activação dos receptores imunes inaptos (usando sequências específicas ou bactérias inteiras)	Eficácia aumentada, segurança possivelmente melhorada	Estudos pré-clínicos
Vacinas com DNA plasmídico codificado	Produção endógena do alergénio poderá resultar em tolerância	Possível tratamento de apenas uma dose	Modelos murinos revelaram respostas específicas às cadeias
Anticorpos anti-IgE	A porção alvo do anticorpo pode inactivar a IgE, com um risco reduzido de activação dos mastócitos	Não específico para um alimento; alguma resposta na gastroenteropatia eosinofílica (estudo piloto)	Estudos preliminares demonstraram limiares melhorados, mas não mostraram uma protecção uniforme
Fitoterapia chinesa	Mecanismos desconhecido	Não específica de um alimento	Modelos murinos demonstraram eficácia; estudos de segurança humana estão a decorrer
Citocinas/anti-citocinas (ex: anti-IL-5)	Interrompem os sinais inflamatórios	Poderá permitir uma interrupção directa dos processos inflamatórios sem recurso a uma restrição alimentar	Estudo preliminar demonstrou benefício na esofagite eosinofílica

ANEXO XII

Tabela 7.1. – Digestibilidade/estabilidade proteica em fluido gástrico simulado (SGF) de alérgenos alimentares vegetais, suspeitos de sensibilizarem através do tracto gastrointestinal (adaptado de: [308]).

Fonte	Alergénio	Família proteica	Estabilidade do alérgeno em SGF (min)	Rácio Pepsina/Alergénio (w:w)	pH
Soja	β -Conglicina (sub-unidade β)	Globulinas 7S (Cupinas)	60a	19 (w:w)	1,2
			120b	13 (w:w)	1,2
	β -Conglicina (sub-unidade α)	Globulinas 7S (Cupinas)	2	19 (w:w)	1,2
			0	13 (w:w)	1,2
	SKTI	Inibidores do tipo “Kunitz” das leguminosas	60a	19 (w:w)	1,2
			120b	13 (w:w)	1,2
			60a	3 (w:w)	2,0
			60a	3 (w:w)	1,2
			60a	3 (w:w)	2,0
			15	19 (w:w)	1,2
			5	13 (w:w)	1,2
	Lecitina (Gly m 1) nsLTP (Gly m 1)	Lecitinas leguminosas nsLTPs (Prolaminas)	0,5	19 (w:w)	1,2
			2	13 (w:w)	1,2
Mostarda	Albumina 2S (Sin a 1)	Albuminas 2S das sementes de armazenamento (Prolaminas)	60a	19 (w:w)	1,2
Colza	Albumina 2S (Bra j 1)		60a	19 (w:w)	1,2
	Albumina 2S (rproBnIb)		60a	16 (w:w)	1,2
Castanha do Brasil	Albumina 2S (Ber e 1)		15	17 (w:w)	1,2
			120b	0,05 (w:w)	2,5
			16	1,3 (w:w)	2,0
Sementes de Sésamo	Albumina 2S (Ses i 1)		120b	0,05 (w:w)	2,5
Sementes de Girassol	Albumina 2S (SFA-8)		30	17 (w:w)	1,2
Amendoim	Globulina 7S (Ara h 1)	Globulinas 7S (Prolaminas)	5	13 (w:w)	1,2
	Conglutina (Ara h 2)	Conglutinas – relacionadas com as albuminas 2S das sementes de armazenamento	60a	19 (w:w)	1,2
			0,5	13 (w:w)	1,2
			0	3 (w:w)	1,2
			0	3 (w:w)	2,0
	Lecitina do amendoim	Lecitinas	8	19 (w:w)	1,2
Batata	Patatina (Sola t 1)	Fosfolipase do tipo da Patatina	5	13 (w:w)	1,2
			0	13 (w:w)	1,2
Pêra	nsLTP (Pru p 3)	nsLTPs (Prolaminas)	30c	20 (w:w)	1,2
Cevada	nsLTP		60a	0,33 (w:w)	2,0
Uva	nsLTP (Gly m 1)		120b	0,05 (w:w)	2,5
Cereja	nsLTP (rPru av 3)		120b	≥ 60 U por μ g de alérgeno (d)	2,5

- a) A digestão com pepsina realizou-se em 60 min.
b) A digestão com pepsina realizou-se em 120 min.
c) A digestão com pepsina realizou-se em 30 min.
d) Pepsina imobilizada em agarose.

ANEXO XIII

Tabela 7.2. - Digestibilidade/estabilidade proteica em fluido gástrico simulado (FGS/SGF) de alergénios alimentares de origem animal (adaptado de: [308]).

Fonte	Alergénio	Família proteica	Estabilidade do alergénio em SGF (min)	Rácio Pepsina/Alergénio	pH
Ovo	Ovomucóide (<i>Gal d 1</i>)	Inibidor de protease com serina, tipo “Kazal”	8	19 (w:w)	1,2
			0	13 (w:w)	1,2
			0,5	3 (w:w)	2,0
	Ovalbumina (<i>Gal d 2</i>)	Serpinas	60a	19 (w:w)	1,2
			5	13 (w:w)	1,2
			30 e 60a	3 (w:w)	1,2
			30 e 60a	3 (w:w)	2,0
			5	2 e 8 (w:w)	1,2
			60a	3 (w:w)	2,0
	Fosvitina (<i>Gal d</i>)	Subunidade 2 – β das Cinases da caseína	60a	19 (w:w)	1,2
	Conalbumina (<i>Gal d 3</i>)	Transferrina	0	19 (w:w)	1,2
			0	13 (w:w)	1,2
Leite	Lisozima (<i>Gal d 4</i>)	Lisozima	60	13 (w:w)	1,2
	β -Lactoglobulina (<i>Bos d 5</i>)	Lipocalinas	60a	19 (w:w)	1,2
			60a	3 (w:w)	2,0
			60a	3 (w:w)	1,2
			60a	3 (w:w)	1,2
			120b	13 (w:w)	1,2
			90c	0,02 (w:w)	2
			90c	0,02 (w:w)	3
			90c	0,02 (w:w)	4
			2	19 (w:w)	1,2
			0	13 (w:w)	1,2
	Caseína (<i>Bos d 8</i>)	Caseínas	0,5	19 (w:w)	1,2
			0	13 (w:w)	1,2
	BSA (<i>Bos d 6</i>)	Albumina do soro	0	19 (w:w)	1,2
			0	13 (w:w)	1,2
			0	0,02 (w:w)	2
			0	0,02 (w:w)	3
			0	0,02 (w:w)	4
			0,5	3 (w:w)	2,0
			0	3 (w:w)	1,2
			0 e 0,5	3 (w:w)	2,0
			0	13 (w:w)	1,2
			0	0,02 (w:w)	2
	α -Lactoalbumina (<i>Bos d 4</i>)	Hidrolases glicosídicas (22)	30	0,02 (w:w)	3
			90c	0,02 (w:w)	4
			0	13 (w:w)	1,2
Camarão	Tropomiosina (<i>Pen a 1</i>)	Tropomiosina	0	13 (w:w)	1,2

- a) A digestão com pepsina realizou-se em 60 min.
b) A digestão com pepsina realizou-se em 120 min.
c) A digestão com pepsina realizou-se em 30 min.

ANEXO XIV

Tabela 6.2. - Aplicações de ELISA seleccionadas para a detecção de alergénios alimentares (adaptado de: [256]).

Metodologia	Deteção do alérgénio	Reactividade cruzada	Amostras	Limite de deteção/sensibilidade	Performance das aplicações
<i>ELISA</i> – antisoro policlonal de inibição do coelho	Amêndoa (principal proteína purificada)	Cajús, feijões, avelã e arroz; sem reacção às proteínas da soja e do arroz	Cereais de pequeno-almoço	Sensibilidade 1-100 ng /ml (<i>ELISA</i> não-competitivo); >300 ng / mL (<i>ELISA</i> competitivo)	-
<i>ELISA</i> – antisoro policlonal do coelho e ovelha (usado como captura e anticorpo 2°)	Amêndoa (refeições com amêndoas torradas)	Noz preta, nozes do Brasil, cajús, avelã, nozes de macadâmia, pistáchios e sementes de sésamo; sem reacção para > 30 legumes, nozes, frutas e outros ingredientes	Cereais, chocolate, produtos diários e outros de confeção	1 µg /g	Gama de deteção da amêndoa: 5-93 µg /g; recuperação 86-100%
<i>ELISA</i> – anticorpos de inibição do coelho (pré-absorvidos contra a caseína e as proteínas do soro)	Leite de vaca (caseína, proteínas do soro e leite inteiro)	Nenhuma reactividade significativa ao bife e às proteínas de soja	Sobremesa gelada de tofu, carne de cachorro e bolonhesa, arroz doce e atum embalado em solução aquosa	Sensibilidade 10 ng /mL	Gama de deteção da caseína: 3-2060 µg / mL, proteínas do soro 2-158 µg / mL, proteínas do leite 14-2220 µg/mL
<i>ELISA</i> – antisoro policlonal do coelho (imunopurificado)	Avelã (extracto proteico)	Nozes, cajú, amêndoa, nozes do Brasil, amendoim e pinhão (0,001-0,0787%); sem reacção para > 20 legumes, nozes, sementes e cereais	Produtos de chocolate, muesli, chocolate e passas	1 µg /g; sensibilidade 0.5 ng / ml - 1 µg/mL	Gama de deteção da avelã: 3 µg /g-230 mg /g; CV 2-16% (excepto para uma amostra de caramelo+biscoito)
ELISA (directo) – antisoro do coelho	Ovo da galinha (clara)	-	Pastas experimentais de carne de porco	0,03% de pó seco; 0,125% de produtos esterilizados	-
<i>ELISA</i> – antisoro policlonal do coelho	Amendoim (extracto proteico)	Nenhuma (22 legumes, nozes e outros ingredientes testados)	Bolachas, chocolates, gelados, frutos secos e sementes, molhos para massa	400 ng /g; sensibilidade 1-63 ng /mL	Gama de deteção 0.29-125 mg /g; recuperação 68-90%; CV 2-22%
<i>ELISA</i> (sandwich) – anticorpos monoclonais	Soja (Gly m Bd 28k – principal alérgénio)	As proteínas de interferência foram removidas por filtração em gel durante a preparação da amostra	Isolado porteico de soja, tofu, kori-dofu e yuba, leite de soja; não detectados em produtos fermentados (molho de soja e sopa miso) e processados com isolado proteico de soja	Sensibilidade 0.2-20 ng por poço	Gama de deteção 28 kDa do alérgénio: 0.14-14 µg/g; recuperação 70-100% (proteína); CV 5-20%

